

# Thèse de Doctorat de L'Université Pierre et Marie Curie

Ecole Doctorale 394

*Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire  
Laboratoire de Recherche en Radiobiologie et Radiopathologie*

## **Implication de la transition endothélium-mésenchyme dans le développement des complications digestives des radiothérapies**

Présentée par

**Elodie MINTET**

Spécialité Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique

Dirigée par le Dr Agnès FRANCOIS

Présentée et soutenue publiquement le 16 décembre 2015

Devant le jury composé de :

Docteur Armelle Leturque

Docteur Fanny Daniel

Professeur Paul Mulder

Docteur Laurent Quéro

Docteur Xavier Treton

Présidente

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

« C'est impossible, dit la Fierté  
C'est risqué, dit l'Expérience  
C'est sans issue, dit la Raison  
Essayons, murmure le Cœur »

William Arthur Ward

## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier chacun des membres du jury d'avoir accepté d'évaluer ce travail de thèse :

- Le Docteur **Armelle Leturque**, pour avoir accepté de présider ce jury
- Le Professeur **Paul Mulder** et le Docteur **Fanny Daniel**, pour avoir accepté d'en être les rapporteurs
- Les Docteurs **Laurent Quéro** et **Xavier Treton**, pour avoir accepté d'en être les examinateurs

Je tiens à remercier **Marc Benderitter** et **Philippe Voisin** de m'avoir accueilli au sein du SRBE et de m'avoir donné l'opportunité de réaliser ce projet dans de très bonnes conditions. Je pense notamment aux différentes occasions qui m'ont été données de présenter mes travaux lors de congrès internationaux, ainsi qu'à mon séjour à Cleveland, qui m'auront permis de prendre confiance en moi et de vivre des moments inoubliables.

Je remercie chaleureusement **Fabien Milliat** pour sa disponibilité, ses nombreux conseils aussi bien techniques que théoriques, et aussi pour ses moments de réflexion intense qui auront valu quelques grattages de tête caractéristiques en réunion... et merci pour ton humour !

Un immense merci à **Agnès François** pour m'avoir fait confiance et pour m'avoir confié ce projet (je me rappelle encore du début... c'est passé si vite !). Merci pour ces trois années à tes côtés qui ont été très enrichissantes. J'ai eu l'opportunité d'évoluer grâce à tes nombreux conseils, tes explications et tes corrections de fautes d'orthographe (aiguë...). Un grand merci pour ton encadrement, ton écoute, ton aide quotidienne dans les manips et merci pour le temps que tu m'as accordé tout au long de ces trois années, qui ont grandement participé à l'accomplissement de ce projet. Je garderai un excellent souvenir de notre travail d'équipe !

Bien évidemment je remercie sincèrement l'ensemble de la team L3R sans qui ces trois années n'auraient pas été les mêmes : **Olivier**, merci pour ton aide, tes conseils en réunion (est-ce que l'échelle de ton graph est correcte ?), et pour ta gentillesse. **Vincent**, merci pour ta bonne humeur et tes conseils « cytométriques » (et l' $\alpha$ -SMA il monte, c'est trop bien!!), et attention avec le café ! **Valérie** et **Georges**, **Georges** et **Valérie**, peu importe l'ordre, vous êtes tout simplement géniaux ! Un énorme merci pour vos précieux conseils, votre aide et votre soutien sans lesquels de nombreuses manips n'auraient pas vu le jour ! Je garderai un excellent souvenir des fous rires partagés avec vous ! Valérie, ça donne quoi les témoins positifs ? Et Georges, la kanamycine c'est finalement pas mal... ne changez rien surtout ! Merci également à **Céline** et **Morgane** pour leur disponibilité et leur gentillesse.

Une pensée particulière pour tous mes camarades thésards, post-docs et stagiaire qui m'auront accompagnés tout au long de cette belle aventure. **Christine**, un énorme merci pour tout le travail que tu as accomplis au cours de ces six mois au labo. Ton implication, ta rigueur et ta

persévérance tout au long de ton projet de master nous aurons permis d'avancer ensemble ! Je suis heureuse d'avoir pu partager ma première expérience d'encadrement avec toi ! Je te propose qu'on se retrouve autour d'un Western-Blot pour en discuter si le cœur t'en dit ! **Fanny**, Fanny Fanny... je ne sais pas par où commencer tellement il y a de choses à dire de toi ! Je suis heureuse d'avoir pu partager ce bureau en ta compagnie ! Je te remercie sincèrement pour ta bonne humeur, pour tooous tes précieux conseils pour la rédaction de ce manuscrit, et je n'oublie pas tes Fannites dont toi seule à le secret ! Je compte sur la Mère Caffin pour étoffer « la liste », (to be continued...). **Emilie**, un bon bout de chemin parcouru ensemble. Je me rappelle du début comme si c'était hier ! Je suis heureuse d'avoir pu partager le bureau avec toi aussi et nos longues discussions ont certainement imbibées les murs du bureau pour des années à venir ! **Cyprien** (Cyp), merci pour ton aide et tes astuces en informatique ! Et merci beaucoup pour tes visites matinales et ton écoute pendant la rédaction ! Bon courage à toi pour la dernière ligne droite ! Je n'oublie pas les **Jérémy's** ! **Jérémy L**, je te confie les clefs de la maison EndoMT ainsi que mes souricettes et n'hésite pas si tu as besoin de conseils pour couler des gels d'agarose... **Jérémy C**, prend bien soin de mes cellules, extraites avec amour et passion. **Sonia**, merci pour tes conseils qui m'auront bien été utiles pour la rédaction et pour après. Au plaisir de voir ta thèse un jour ! **Frédéric**, plein de courage pour ce début de thèse qui je suis certaine sera très enrichissante et pleine de rebondissement (P.S : tes t-shirts sont excellents !).

Je tiens à remercier l'ensemble des personnes avec lesquelles j'ai eu la chance de collaborer au cours de ce projet. Mes pensées vont vers **Claudio** et **Gail** qui ont généreusement pris le temps de m'initier à l'extraction des HIMECs, et qui avec **Christopher**, ont su rendre mon séjour à Cleveland inoubliable !

Je tiens également à remercier les collègues du LR2I : **Radia**, **Alain** (un grand merci pour tes conseils, ton écoute matinale et surtout d'avoir supporté « mes pauses réflexion » dans ton bureau), **Stéphane** (l'exterminateur de nounours en guimauve), **Claire** (merci pour ta bonne humeur et ta gentillesse), **Alhondra** (eres un solecito !), **Benoît**, merci pour tous tes conseils ! Et je n'oublie pas tes blagues, tes intrusions animées dans le bureau ainsi que tes chansons improbables qui auront égayé les journées ! Bon courage à toi aussi pour cette dernière année, mais je ne me fais pas trop de souci, tu vas cartonner ! **Bruno**, merci pour tes blagues toujours appropriées qui m'auront procuré de bons fous rires ! **Christine**, je suis sûre que les papotages discrets du bureau d'à côté te manqueront, hein ? Un merci à **Bastien** (c'est quand qu'on mange ?), **Christelle**, **Noëlle**, **Alexandra**, **Lara**, **Alison**, **Valérie**, **Carine**, **Alexandre** et **Delphine**.

Un merci aux collègues du LDB : **Gaëtan** (je ne vois plus le japon de la même façon), **Aurélie** (bon courage pour la rédaction, je suis sûre que tu vas gérer !), **Amélie** (bonne chance pour la thèse et merci pour ta bonne humeur !), **Géraldine**, **Éric**, **Sandrine**, **Cécile**, **Pascale**.

Je remercie également les collègues du LRTOX : **Jean-Marc**, **Yann** (Yannos), **Stéphane**, **Teni** (Tenios), **Stéfania** (Stéfanios, tu veux un trident ?), **Marie**, **Clélia**, **Brice**, **Christelle D**, **Christelle E**, **Audrey**, **Philippe**, **Dimitri**, **Florence** et **Maamar**.



Mes remerciements vont également à **Laurence**, ainsi qu'à **Véronique** et **Sandra** pour leur aide au quotidien. **Sandra**, merci pour ta bonne humeur communicative et pour tes anecdotes improbables ! Un grand merci pour ton efficacité et pour toutes les fois où tu m'as aidé ! Je n'oublie pas **Chloé**, la seule et l'unique avec son énergie incroyable ! Merci pour tout ce que tu fais chaque jour au labo et pour ta joie de vivre et ta gentillesse qui te caractérise ! **Yoann**, sans qui les irradiations n'auraient pas été les mêmes. Merci pour ta disponibilité, ta gentillesse et pour toutes les fois où tu m'as aidé dans les irradiations ! Bon courage pour la suite.

J'adresse mes sincères remerciements à tous mes amis ainsi qu'aux personnes que j'ai pu côtoyer au cours de cette aventure. **Mélissa** et **Guillaume**, je vous remercie pour votre soutien infailible et votre amitié depuis maintenant dix ans ! Une pensée particulière pour **Lionel**, « il n'y a point de bonheur sans courage, ni de vertu sans combat ». Je remercie également **Marie-Anne** et **Laure** (merci pour votre soutien depuis le début les filles !), **Sarita**, **Arige**, **Elodie** et **Arnaud**. **Blaise**, je tiens à te remercier tout particulièrement pour tes nombreux encouragements et ton soutien qui m'auront aidé à de nombreuses reprises au cours de cette année, tu le sais ça ? Une pensée pour l'ensemble des personnes que j'ai pu rencontrer au cours de ma thèse et avec lesquelles j'ai partagé de bons moments **Zakaria**, **Hugues**, **Azza**, **Nicolas**, **Sebastian**, **Sabine**, **Sarah**, **Nadia**, **Simon**, **Damien**.

Enfin, une pensée affectueuse pour ma famille. Je remercie mes parents pour leur soutien indéfectible, leurs encouragements et pour l'intérêt qu'ils ont toujours portés à mes choix. Merci à mes frères, **Guillaume** et **Clément** que je ne vois pas souvent mais qui sont également présent pour m'encourager et me pousser à avancer. J'ai une pensée pour mes grands-parents et mon oncle qui me soutiennent également depuis tout ce temps !

Merci à vous tous.

### Publications

---

Rannou E, François A, Guipaud O, Buard V, Tarlet G, Toullec A, **Mintet E**, Jaillet C, Iruela-Arispe ML, Benderitter M, Sabourin JC and Milliat F. *In vivo evidence for an endothelium-dependent mechanism in radiation-induced normal tissue injury* – Accepté dans **Scientific Reports**, Septembre 2015.

**Mintet E**, Rannou E, Buard V, Weist G, Guipaud O, Tarlet G, Sabourin JC, Benderitter M, Fiocchi C, Milliat F, François A. *Identification of endothelial to mesenchymal transition as a potential participant to radiation-induced proctitis* – Publié dans **The American Journal Of Pathology**, Septembre 2015.

Blirando K, **Mintet E**, Buard V, Sabourin JC, Benderitter M, Milliat F, François A. *Osteopontin knockout does not influence the severity of rectal damage in a preclinical model of radiation proctitis in mice* - Publié dans **Digestive Diseases and Sciences**, Juin 2015.

### Communications orales

---

**Mintet E**, Rannou E, Buard V, Weist G, Guipaud O, Tarlet G, Sabourin JC, Benderitter M, Fiocchi C, Milliat F, François A. *Identification of endothelial to mesenchymal transition as a potential participant to radiation-induced proctitis* – **15<sup>th</sup> International Congress of Radiation Research**, travel award, Mai 2015, Kyoto, (Japon).

Rannou E, François A, Toullec A, Guipaud O, Buard V, Tarlet G, **Mintet E**, Benderitter M, Sabourin JC, Milliat F. *Endothelial specific PAI-1 deletion protects against radiation-induced intestinal injury and influences inflammatory response* - **15<sup>th</sup> International Congress of Radiation Research**, Mai 2015, Kyoto, (Japon).

**Mintet E**, Rannou E, Buard V, Weist G, Guipaud O, Tarlet G, Sabourin JC, Benderitter M, Fiocchi C, Milliat F, François A. *Implication de la transition endothélium-mésenchyme dans le développement des complications digestives des radiothérapies* - **Journées des Thèses IRSN**, Mars 2015, l'Isle-sur-la-Sorgue (France).

**Mintet E**. *Les cellules endothéliales irradiées: un peuple migrateur?* – **1<sup>er</sup> Prix du Concours IRSN « Ma thèse en 180 secondes »**, Journées des Thèses IRSN, Mars 2015, Isle-sur-la-Sorgue (France).

**Mintet E**, Rannou E, Buard V, Weist G, Guipaud O, Tarlet G, Sabourin JC, Benderitter M, Fiocchi C, Milliat F, François A. *Identification of endothelial to mesenchymal transition as a potential participant to radiation-induced proctitis* – **41st Annual Meeting of the European Radiation Research Society**, Septembre 2014, Rhodes (Grèce).

**Mintet E**, Rannou E, Buard V, Weist G, Guipaud O, Tarlet G, Sabourin JC, Benderitter M, Fiocchi C, Milliat F, François A. *Implication de la transition endothélium-mésenchyme dans le développement des complications digestives des radiothérapies* - **Journées des Thèses de l'ED394**, Mai 2015, Paris (France).

**Mintet E**, Rannou E, Buard V, Weist G, Guipaud O, Tarlet G, Sabourin JC, Benderitter M, Fiocchi C, Milliat F, François A. *Implication de la transition endothélium-mésenchyme dans le développement des complications digestives des radiothérapies* - **Journées des Thèses IRSN**, Mars 2014, Paris (France).

**Mintet E**, Rannou E, Buard V, Weist G, Guipaud O, Tarlet G, Sabourin JC, Benderitter M, Fiocchi C, Milliat F, François A. *Implication de la transition endothélium-mésenchyme dans le développement des complications digestives des radiothérapies* - **11<sup>ème</sup> Colloque International de Radiobiologie Fondamentale et Appliquée**, Octobre 2013, La Grande-Motte (France).

## Communications affichées

---

**Mintet E**, Rannou E, Buard V, Weist G, Guipaud O, Tarlet G, Sabourin JC, Benderitter M, Fiocchi C, Milliat F, François A. *Identification of endothelial to mesenchymal transition as a potential participant to radiation-induced proctitis* – **The 61st Annual Meeting of the Radiation Research Society**, Septembre 2015, Weston (USA).

**Mintet E**, Rannou E, Buard V, Weist G, Guipaud O, Tarlet G, Sabourin JC, Benderitter M, Fiocchi C, Milliat F, François A. *Identification of endothelial to mesenchymal transition as a potential participant to radiation-induced proctitis* – **2<sup>nd</sup> Educational Symposium on Radiation and Health by young Scientists**, Prix Poster, Mai 2015, Hiroaki (Japon).

**Mintet E**, Rannou E, Buard V, Weist G, Guipaud O, Tarlet G, Sabourin JC, Benderitter M, Fiocchi C, Milliat F, François A. *Implication de la transition endothélium-mésenchyme dans le développement des complications digestives des radiothérapies* - **Journées de l'ED394**, Mai 2013, Paris (France).

**Mintet E**, Rannou E, Buard V, Weist G, Guipaud O, Tarlet G, Sabourin JC, Benderitter M, Fiocchi C, Milliat F, François A. *Implication de la transition endothélium-mésenchyme dans le développement des complications digestives des radiothérapies* - **Journées des Thèses IRSN**, Octobre 2013, Presqu'île de Giens (France).

## Sommaire

<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS</b>	9
<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b>	11
<b>AVANT-PROPOS</b>	17
<b>INTRODUCTION</b>	19
<b>Chapitre 1. Radiothérapie : généralités et principes</b>	19
1. Rayonnements ionisants	19
a. Les différents types de rayonnements	19
b. Effets biologiques des rayonnements ionisants	20
2. La radiothérapie : un outil clef dans le traitement des cancers	24
a. Applications en radiothérapie : de l'Histoire à aujourd'hui	24
b. Pathologies secondaires associées à la radiothérapie	26
3. La toxicité radio-induite aux tissus sains	27
<b>Chapitre 2. Dommages radio-induits aux tissus sains : cas du tube digestif</b>	31
1. Structure et fonctions du tube digestif chez l'Homme	31
2. L'intestin : un organe radiosensible	35
a. Dommages radio-induits à l'intestin	35
b. Conséquences tissulaires des rayonnements : cas du rectum	36
3. Gestion clinique actuelle des séquelles digestives radio-induites	38
a. Gestion clinique des dommages aigus	38
b. Gestion clinique des lésions chroniques	39
4. Toxicité digestive radio-induite : vers une meilleure compréhension des séquelles	41
5. Toxicité radio-induite : du concept de cellule cible à la réponse intégrée	42
a. Le concept de la « cellule cible »	42
b. Les lésions radio-induites aux tissus sains : une réponse orchestrée	44
6. Caractéristiques de la réponse inflammatoire radio-induite	46
<b>Chapitre 3. La fibrose intestinale radio-induite</b>	51
1. De la cicatrisation à la fibrose : un équilibre fragile	51
a. La phase pré-fibreuse	52
b. La fibrose jeune	52
c. Le développement de la fibrose établie	53
2. Myofibroblaste et fibrose : un acteur cellulaire déterminant	54
3. Principaux acteurs moléculaires de la fibrose	57
a. Le TGF- $\beta$ 1 dans l'initiation de la fibrose	58
b. Rôle du CTGF dans le maintien de la fibrose	61

c. Le TGIF1	62
d. Autre acteur de la fibrose: l'endothéline-1	63
4. Modélisation de la fibrose radio-induite chez l'animal	63
a. Modèle d'irradiation colorectale	64
b. Irradiation localisée de l'intestin grêle : modèle de l'anse extériorisée	66
5. Recherche sur les thérapeutiques anti-fibrosantes : quelles cibles privilégier ?	68
a. Limiter le dépôt de matrice extracellulaire	68
b. Autre stratégie : cibler les mécanismes cellulaires précoces	72
c. Thérapie moléculaire : ciblage des micros ARN	74
d. Thérapie cellulaire et les cellules souches mésenchymateuses	75
<b>Chapitre 4. Compartiment vasculaire et dommages radio-induits</b>	<b>77</b>
1. Structure et fonctions du compartiment vasculaire	77
2. Compartiment vasculaire et fonctions biologiques associées	79
3. Compartiment vasculaire et rayonnements ionisants : quelles conséquences ?	82
a. Apoptose radio-induite des cellules endothéliales	83
b. Activation radio-induite des cellules endothéliales	87
4. Dysfonction endothéliale et dommages radio-induits : quels liens ?	92
<b>Chapitre 5. La transition endothélium-mésenchyme</b>	<b>94</b>
1. EndoMT en physiologie : formation des valves cardiaques	94
2. Caractérisation fonctionnelle des cellules au cours de l'EndoMT	101
3. EndoMT : du développement cardiovasculaire aux processus pathologiques	103
a. Implication de l'EndoMT dans les pathologies fibrotiques	104
b. EndoMT et cancer : un acteur de la progression tumorale	106
c. EndoMT et vasculopathies fibroprolifératives	108
d. L'EndoMT et pathologies radio-induites	111
4. Régulation de l'EndoMT : un système complexe	113
a. Le TGF- $\beta$ : un acteur clef dans l'induction de l'EndoMT	114
b. La voie Notch dans l'initiation de l'EndoMT	117
c. Hey2 : un acteur potentiel de l'EndoMT dépendante de Notch	120
d. Interaction des voies Notch et TGF- $\beta$ dans l'induction de l'EndoMT	123
5. L'EndoMT comme cible thérapeutique anti-fibrosante	125
<b>PRROBLEMATIQUE &amp; OBJECTIFS</b>	<b>128</b>
<b>RESULTATS</b>	<b>129</b>
<b>DISCUSSION &amp; PERSPECTIVES</b>	<b>160</b>
1. Mise en évidence de l'EndoMT radio-induite chez l'homme	162
2. Choix du modèle préclinique chez la souris	163
3. Caractéristiques du modèle Tie2-GFP et mise en évidence de l'EndoMT	165

4. Caractérisation de l'EndoMT <i>in vitro</i> : les HIMEC un modèle optimal	168
5. Recherche d'une cible moléculaire de l'EndoMT radio-induite	172
6. Perspectives de recherche sur l'EndoMT radio-induite : la protéine mTOR	176
<b>CONCLUSION GENERALE</b>	181
<b>ANNEXES</b>	182
<b>Annexe 1</b> : Présentation des différents types de radiothérapies	182
<b>Annexe 2</b> : Notion d'organe à risque en radiothérapie : cas du rectum dans le traitement du cancer de la prostate	183
<b>Annexe 3</b> : Score des complications chroniques digestives défini par le RTOG/EORTC	184
<b>Annexe 4</b> : Comparaison de l'EndoMT et de l'EMT : physiologie, physiopathologie et mécanismes	185
<b>Annexe 5</b> : Principales étapes nécessaires à l'extraction des HIMECs	186
<b>Annexe 6</b> : Caractéristiques génétiques de la souche de souris Hey2 <sup>fix/fix</sup>	187
<b>Annexe 7</b> : Stratégie de croisement permettant l'obtention des souris HEY2 KO <sup>endo</sup>	188
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	189

## Table des illustrations

<b>Figure 1 :</b> Représentation schématique des différents niveaux de pénétration des rayonnements ionisants	20
<b>Figure 2:</b> Conséquences cellulaires des rayonnements ionisants	22
<b>Figure 3:</b> Organisation fonctionnelle du côlon chez l'Homme	32
<b>Figure 4 :</b> Unité fonctionnelle de la muqueuse colorectale, la crypte de Lieberkühn	34
<b>Figure 5 :</b> Histopathologie de la rectite radique chez l'Homme	37
<b>Figure 6 :</b> Illustrations de deux techniques innovantes	41
<b>Figure 7 :</b> Cinétique des événements cellulaires et moléculaire majeurs impliqués dans la réponse tissulaire radio-induite	45
<b>Figure 8 :</b> Principales étapes de la réponse inflammatoire radio-induite : relation entre inflammation et fibrose digestive	47
<b>Figure 9 :</b> Etapes du développement de la fibrose digestive radio-induite	53
<b>Figure 10 :</b> Relation entre la matrice extracellulaire et l'activation myofibroblastique	55
<b>Figure 11 :</b> Les myofibroblastes dans la fibrose	56
<b>Figure 12 :</b> Les principales fonctions du TGF- $\beta$	59
<b>Figure 13 :</b> Vue d'ensemble de la voie canonique SMAD-dépendante du TGF- $\beta$ 1 et de la voie Rho/ROCK	60
<b>Figure 14 :</b> Dispositif d'irradiation colorectale chez la souris : modélisation de la rectite radique	65
<b>Figure 15 :</b> Modélisation de la fibrose colorectale radio-induite chez la souris	66
<b>Figure 16 :</b> Modélisation de l'entérite radique chez la souris : irradiation localisée d'une anse d'intestin grêle	67
<b>Figure 17 :</b> Exemples de stratégies thérapeutiques pour réduire les dommages radio-induits aux tissus sains	72
<b>Figure 18 :</b> Organisation du réseau vasculaire	78
<b>Figure 19 :</b> Les principales fonctions de l'endothélium vasculaire	81
<b>Figure 20 :</b> Lésions vasculaires radio-induites	83
<b>Figure 21 :</b> Illustration des deux voies de synthèse des céramides et implication dans l'apoptose radio-induite des cellules endothéliales	85

<b>Figure 22 :</b> Etapes du recrutement et de l'adhésion des leucocytes à la surface de l'endothélium	89
<b>Figure 23 :</b> Représentation de la thromborésistance endothéliale	91
<b>Figure 24 :</b> Rôle de l'EndoMT au cours du développement embryonnaire : formation du septum et des valves cardiaques	95
<b>Figure 25 :</b> Illustration de l'EndoMT	97
<b>Figure 26 :</b> Présentation des différentes formes de différenciation cellulaire	100
<b>Figure 27 :</b> Rôle de l'EndoMT et de l'EMT dans le développement tumoral	107
<b>Figure 28 :</b> Remodelage vasculaire pulmonaire de l'HAP au cours de la sclérodermie	109
<b>Figure 29 :</b> Implication de l'EndoMT dans la fibrodysplasie ossifiante progressive (FOP) et perspectives en thérapie cellulaire	111
<b>Figure 30 :</b> Principales pathologies associées à l'EndoMT	113
<b>Figure 31 :</b> Rôle de la voie TGF- $\beta$ dans l'équilibre stimulation/inhibition	115
<b>Figure 32 :</b> Principaux acteurs de la voie canonique Notch	119
<b>Figure 33 :</b> Transduction du signal Notch1/Jag1/Hey1-Hey2 dans la cellule endothéliale : contrôle de la spécialisation artérielle	122
<b>Figure 34 :</b> Représentation simplifiée de voies de signalisation intracellulaire impliquées dans l'EndoMT	125
<b>Figure 35 :</b> Etude la spécificité du modèle Tie2-GFP : extinction de la GFP par greffe de moelle osseuse	167
<b>Figure 36 :</b> Hypothèse du rôle de Hey2 dans l'induction de l'EndoMT radio-induite	174
<b>Figure 37 :</b> Relation entre l'apoptose, la sénescence et l'autophagie dans l'initiation de l'EndoMT	180
 <b>Tableau 1 :</b> Les principales techniques de radiothérapie externe	 25
<b>Tableau 2 :</b> Principaux organes à risque en radiothérapie	28
<b>Tableau 3 :</b> Modélisation des effets aigus et tardifs au niveau de l'intestin grêle et du côlon	64
<b>Tableau 4 :</b> Principaux marqueurs de l'EndoMT suivis dans la littérature	98



## Liste des abréviations

<b>ADAM</b>	A Disintegrin And Metalloproteinase
<b>ADN</b>	Acide DésoxyRiboNucléique
<b>ALK</b>	Activin-Like Kinase
<b>AP-1</b>	Activator Protein-1
<b>ARN</b>	Acide RiboNucléique
<b>ASMase</b>	Acid SphingoMyelinase
<b>AT-1</b>	AngioTensin II-receptor-1
<b>BAEC</b>	Bovin Aortic Endothelial Cell
<b>Bcl-2</b>	B cell lymphoma-2
<b>bFGF</b>	basic Fibroblast Growth Factor
<b>bHLH</b>	basic Helix-Loop-Helix
<b>Bmi-1</b>	B lymphoma Mo-MLV Insertion region 1 homolog
<b>BMP-7</b>	Bone Morphogenic Protein-7
<b>c-Abl</b>	c-Abelson tyrosine kinase
<b>CAEC</b>	Coronary Aortic Endothelial Cell
<b>CAF</b>	Carcinoma-Associated Fibroblast
<b>CAM</b>	Cell Adhesion Molecule
<b>CBC</b>	Crypt Base Columnar cell
<b>CE</b>	Cellule Endothéliale
<b>CML</b>	Cellule Musculaire Lisse
<b>CPAg</b>	Cellule Présentatrice de l'Antigène
<b>CRP</b>	Ceramide Rich Plateform
<b>CS</b>	Ceramide Synthase
<b>CSI</b>	Cellule Souche Intestinale

<b>CSM</b>	Cellule Souche Mésenchymateuse
<b>CTGF</b>	Connective Tissue Growth Factor
<b>CTMC</b>	Connective Tissue Mast Cell
<b>CTV</b>	Clinical Target Volume
<b>CXCL8</b>	CXC-Chemokine Ligand 8
<b>DAMP</b>	Damage-Associated Molecular Pattern
<b>EMT</b>	Epithelial to Mesenchymal Transition
<b>EndoMT</b>	Endothelial to mesenchymal transition
<b>eNOS</b>	endothelial Nitric-Oxyde Synthase
<b>ERK1/2</b>	Extracellular signal-Regulated Kinase 1/2
<b>ET-1</b>	Endothéline-1
<b>FAK</b>	Focal Adhesion Kinase
<b>FGF2</b>	Fibroblast Growth Factor 2
<b>FN-1</b>	FibroNectine-1
<b>FOP</b>	Fibrodysplasie Ossifiante Progressive
<b>FSP-1</b>	Fibroblast Specific Protein-1
<b><math>\gamma</math>-H<sub>2</sub>AX</b>	Histone H2A de la famille X
<b>G-CSF</b>	Granulocyte Colony-Stimulating Factor
<b>GLP-2</b>	Glucagon-Like Peptide-2
<b>GM-CSF</b>	Granulocyte-Monocyte Colony-Stimulating Factor
<b>GN</b>	Granulocyte Neutrophile
<b>GSK-3<math>\beta</math></b>	Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$
<b>GTV</b>	Gross Target Volume
<b>Gy</b>	Gray
<b>HAP</b>	Hypertension Artérielle Pulmonaire
<b>HCMEC</b>	Human Cutaneous Microvascular Endothelial Cell
<b>HDMEC</b>	Human Dermal Microvascular Endothelial Cell

<b>HES</b>	Hairy and Enhancer of Split-related
<b>Hey</b>	Hairy and Enhancer of Split-related with YRPW motif
<b>HGF</b>	Hepatocyte Growth Factor
<b>HIF-1<math>\alpha</math></b>	Hypoxia Inducible Factor-1 $\alpha$
<b>HIMEC</b>	Human Intestinal Microvascular Endothelial Cell
<b>HMVEC-L</b>	Human Microvascular Endothelial Cell-Lung
<b>ICAM-1</b>	InterCellular Adhesion Molecule-1
<b>IGF-1</b>	Insulin Growth Factor-1
<b>IL6</b>	Interleukine 6
<b>IMRT</b>	Intensity-Modulated Radiation Therapy
<b>LAP</b>	Lantency-Associated Peptide
<b>LDL</b>	Low Density Lipoprotein
<b>LET</b>	Linear Energy Transfert
<b>Lgr5</b>	Leucin-rich repeat-containing G-protein coupled Receptor 5
<b>LLC</b>	Large Latent Complex
<b>LOX</b>	Lysyl OXydase
<b>LTBP-1</b>	Latent TGF- $\beta$ 1-Binding Protein-1
<b>MAML</b>	MAsterMind-Like protein
<b>MAPK</b>	Mitogen-Activated Protein Kinase
<b>MC</b>	Maladie de Crohn
<b>MCP-1</b>	Monocyte Chimio Attractant Protein-1
<b>MEC</b>	Matrice ExtraCellulaire
<b>MIP-2</b>	Macrophage Inflammatory Protein-2
<b>MMP</b>	MatrixMetalloProteinase
<b>MnSOD</b>	Manganese-dependant SuperOxide Dismutase
<b>MPO</b>	MyéloPerOxidase
<b>MRTF</b>	Myocardin-Related Transcription Factor

<b>NF-κB</b>	Nuclear Factor-κB
<b>NO</b>	Nitric Oxyde
<b>OP-1</b>	Osteogenic Protein-1
<b>OAR</b>	Organes À Risque
<b>PAEC</b>	Pulmonary Aortic Endothelial Cell
<b>PAF</b>	Platelet-Activating Factor
<b>PAI-1</b>	Plasminogen Activator Inhibitor type-I
<b>PBMC</b>	Peripheral Blood Mononuclear Cells
<b>PBRT</b>	Proton Beam Radiation Therapy
<b>PDGF</b>	Platelet-Derived Growth Factor
<b>PECAM-1</b>	Platelet/Endodhelial Cell-Adhesion Molecule-1
<b>PGI<sub>2</sub></b>	Prostaglandine I <sub>2</sub>
<b>PI3K</b>	PhosphoInositide 3-Kinase
<b>PKB</b>	Protein Kinase B
<b>PKC</b>	Protein Kinase C
<b>PTV</b>	Planning Target Volume
<b>PTX</b>	Pentoxifylline
<b>PUMA</b>	Protein p53 Upregulated Modulator of Apoptosis
<b>RBP-Jκ</b>	Recombining Binding Protein suppressor-Jκ
<b>RCH</b>	Rectocolite Hémorragique
<b>RNS</b>	Reactive Nitrogen Species
<b>ROCK</b>	Rho-associated Coiled-coil-containing protein Kinase
<b>ROS</b>	Reactive Oxygen Species
<b>SAPK-JNK</b>	Stress-Activated Protein Kinase/cJun N-terminal Kinase
<b>SASP</b>	Senescence-Associated Secretory Phenotype
<b>SGI</b>	Syndrome Gastro-Intestinal
<b>SIP1</b>	Smad Interacting Protein 1

<b>SM22<math>\alpha</math></b>	Smooth Muscle 22 $\alpha$
<b>SMAD</b>	Small Mother Against Decapentaplegic
<b>SNC</b>	Système Nerveux Central
<b>SOD</b>	SuperOxide Dismutase
<b>TAM</b>	Tumour-Associated Macrophages
<b>T<math>\beta</math>R</b>	TGF- $\beta$ Receptor
<b>TEM</b>	Microscopie Electronique en Transmission
<b>TFPI</b>	Tissue Factor Pathway Inhibitors
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Tissue Growth Factor- $\beta$
<b>TGIF1</b>	TG-Interacting Factor 1
<b>Tie</b>	Tyrosine kinase with Immunoglobulin and EGF homology domains
<b>TIMP</b>	Tissue Inhibitor MetalloProteinase
<b>TLR</b>	Toll-Like Receptor
<b>TM</b>	ThromboModule
<b>TNBS</b>	2, 4, 6-Tri-NitroBenzene Sulfonic acid
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Tumor Necrosis Factor $\alpha$
<b>t-PA</b>	tissue-Plasminogen Activator
<b>TSP-1</b>	ThromboSPondin-1
<b>TUNEL</b>	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyUridine triphosphate Nick End Labeling
<b>u-PA</b>	urokinase-Plasminogen Activator
<b>VCAM-1</b>	Vascular Cell-Adhesion Molecule-1
<b>VE-cadhérine</b>	Vascular Endothelial Cadhérine
<b>VEGF</b>	Vascular Endothelial Growth Factor
<b>vWF</b>	von Willebrand Factor
<b>WPB</b>	Weibel-Palade Body
<b>XIAP</b>	X-linked Inhibitor of Apoptosis
<b>YFP</b>	Yellow Fluorescent Protein

<b>ZEB1</b>	Zinc finger E-box-Binding homeobox 1
<b><math>\alpha</math>-SMA</b>	$\alpha$ -Smooth Muscle Actin

## Avant-Propos

La radiothérapie est considérée comme un outil indispensable dans l'arsenal thérapeutique déployé pour traiter les cancers. Cette thérapie peut être utilisée seule ou en association avec une chimiothérapie, une hormonothérapie ou encore une chirurgie. Comme pour tout traitement, il existe une balance entre les bénéfices thérapeutiques et les risques liés à son utilisation principalement dus à la non spécificité de ce traitement vis-à-vis des cellules tumorales. Le but de la radiothérapie consiste à délivrer une quantité maximale de rayonnements ionisants à la tumeur tout en préservant au maximum les tissus sains environnants. Ainsi, les dommages radio-induits aux tissus sains constituent la principale limite dans l'escalade de dose pouvant être délivrée à la tumeur, et de façon générale impactent l'efficacité du traitement. En 2014, près de 355 000 nouveaux cas de cancers ont été diagnostiqués en France, dont la moitié d'entre eux concerne des tumeurs de la sphère abdomino-pelvienne parmi lesquelles le cancer de la prostate, du col de l'utérus ou de la vessie par exemple. Dans ce contexte, des portions du tube digestif peuvent se retrouver dans le champ d'irradiation et recevoir une quantité de dose non négligeable associée avec le développement d'effets secondaires invalidants. Il est admis qu'environ 80% des patients développent des effets secondaires aigus de type entérite radique, pouvant évoluer vers des effets chroniques de type fibrose chez 5 à 10 % d'entre eux. Ces séquelles chroniques sont par ailleurs associées avec une importante détérioration de la qualité de vie des patients au long terme et peuvent être létales dans les cas les plus graves. De plus, les stratégies thérapeutiques actuelles pour traiter ces patients restent à ce jour limitées et ont une visée essentiellement symptomatique.

De par l'augmentation du nombre de patients concernés chaque année par ces effets secondaires digestifs radio-induits, et vu le manque de moyens thérapeutiques disponibles, la mission du Laboratoire de Recherche en Radiobiologie et Radiopathologie consiste à améliorer les connaissances sur la réponse des tissus sains aux rayonnements ionisants et plus précisément, d'identifier les mécanismes cellulaires et moléculaires physiologiques et physiopathologiques impliqués dans l'évolution de ces dommages au niveau digestif. En ce sens, le laboratoire se concentre plus particulièrement sur un compartiment cellulaire donné, à

savoir le compartiment endothélial, et le rôle de ce dernier dans l'initiation et le développement des dommages radio-induits au niveau du tube digestif.

Ainsi, la stratégie de recherche du laboratoire repose sur l'étude des événements vasculaires précoces dont la modulation pourrait réduire la sévérité de l'atteinte tardive. C'est dans ce contexte que s'est inscrit ce travail de thèse qui a consisté à étudier un mécanisme cellulaire particulier propre aux cellules endothéliales, la transition endothélium-mésenchyme ou EndoMT, et le rôle de ce phénomène dans l'initiation et le développement de la fibrose radio-induite au niveau colorectal. L'objectif premier de ce projet de thèse a été de mettre en évidence l'EndoMT dans le contexte de l'irradiation, puis de caractériser ce phénomène et d'améliorer les connaissances concernant les mécanismes moléculaires assurant sa régulation qui pourraient être envisagés comme cibles thérapeutiques.



### Chapitre 1. Radiothérapie : généralités et principes

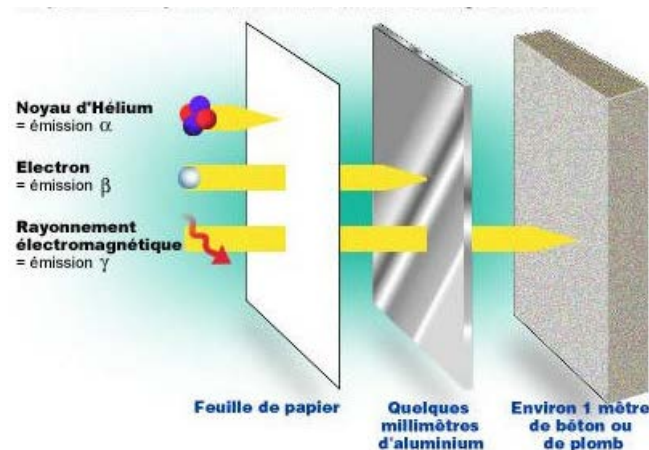
La radiothérapie est aujourd'hui un outil indispensable dans la stratégie thérapeutique mise en œuvre pour traiter de nombreux cancers. Il s'agit d'un traitement non-invasif basé sur l'utilisation locorégionale de rayonnements ionisants permettant la destruction ciblée mais non spécifique des cellules tumorales. Le but de cette thérapie est de favoriser le contrôle tumoral avec possibilité de stérilisation totale de la tumeur tout en essayant de préserver au maximum les tissus sains environnants. Ce traitement est couramment prescrit de nos jours mais dans certains cas son utilisation est associée avec le développement de lésions secondaires graves, difficiles à appréhender et à maîtriser dans le temps.

#### 1. Rayonnements ionisants

##### a. Les différents types de rayonnements

Un rayonnement est défini comme une émission d'énergie et/ou d'un faisceau de particules dans un espace. Certains rayonnements sont dits « ionisants », c'est-à-dire qu'ils possèdent une énergie suffisante pour « arracher » des électrons aux atomes constituant la matière qu'ils traversent. Les atomes ayant ainsi perdu ou reçu un/des électron(s) deviennent instables et vont émettre différents types de particules afin de retourner vers une conformation plus stable. On distingue ainsi deux types de rayonnements ionisants: les rayonnements primaires (électriquement chargés) **directement ionisants** tels que les rayonnements  $\alpha$  et  $\beta$  et les rayonnements non chargés ou **indirectement ionisants**, tels que les photons (rayons X et  $\gamma$ ) ou encore les neutrons. Chacun d'eux possède des niveaux d'énergie et de pénétration de la matière différents. Les rayonnements  $\alpha$  et  $\beta$  (type noyau d'Hélium ou électrons) ont un faible pouvoir de pénétration alors que les rayonnements X et  $\gamma$  sont dits pénétrants. L'effet d'un rayonnement va également dépendre du niveau d'énergie des particules émises, on parle aussi de transfert d'énergie linéique (Linear Energy Transfert, LET). De cette façon, les rayonnements sont classés en fonction de la quantité d'énergie déposée dans la matière. On

distingue les low-LET comprenant les rayons X,  $\gamma$  et les particules  $\beta$  entraînant un faible dépôt d'énergie dans la matière, et les high-LET (neutrons et particules  $\alpha$ ) qui sont associés avec une plus grande quantité d'énergie déposée dans la zone cible. D'un point de vue biologique, les high-LET engendrent des dommages plus importants que les low-LET. Ainsi, les effets provoqués dans la matière et les moyens de protection seront donc fonction du type de particules émises (**Figure 1**).



**Figure 1** : Représentation schématique des différents niveaux de pénétration des rayonnements ionisants (<http://www.irs.fr>)

La découverte des rayons X et de la radiographie par Wilhelm Röntgen en 1895 a conduit à d'importantes avancées scientifiques sur lesquelles sont basées de nombreuses techniques médicales actuelles. Aujourd'hui, les rayonnements ionisants sont utilisés dans divers domaines d'activité tels que le secteur industriel (processus de stérilisation, gammagraphie), le secteur énergétique (centrale nucléaire) ou couramment dans le secteur médical (imagerie, radiologie interventionnelle, radiothérapie).

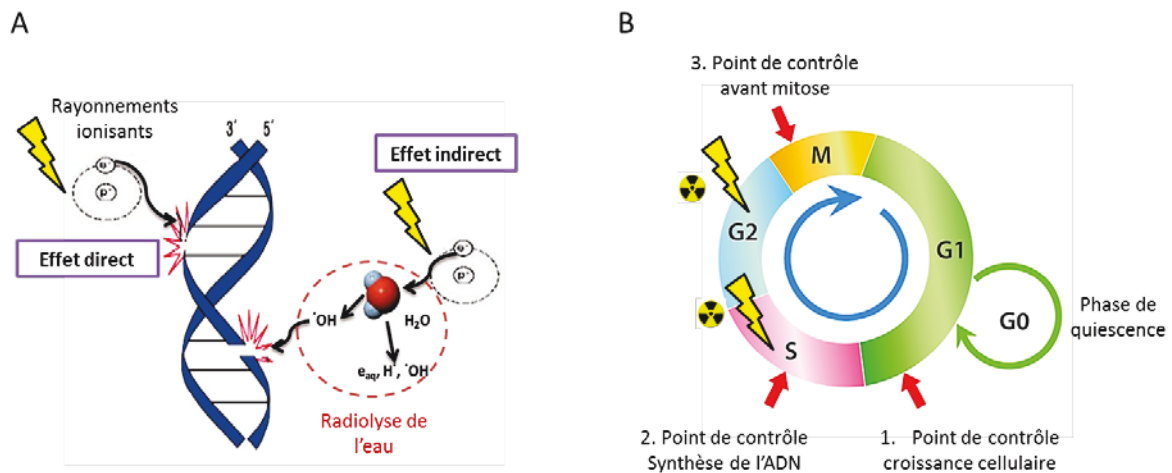
### **b. Effets biologiques des rayonnements ionisants**

La notion de dose est utilisée pour mieux comprendre l'impact des rayonnements ionisants sur la matière vivante. Tout d'abord, on définit la **dose absorbée** par la quantité d'énergie absorbée par la matière vivante, celle-ci étant mesurée en Gray (Gy). Ainsi, 1 Gy correspond à un transfert d'énergie de 1 joule à 1 kilogramme de matière. Deux autres doses sont ensuite calculées à partir de la dose absorbée : la première est la **dose équivalente** qui

permet de prendre en compte le type de rayonnement utilisé, la seconde correspond à la **dose efficace** qui prend en compte la nature du tissu biologique. Ces deux doses sont exprimées en Sievert (Sv).

Les effets biologiques des rayonnements ionisants sont la conséquence directe des effets physico-chimiques dans le tissu irradié, et peuvent conduire à la perte de l'intégrité du génome. La formation et l'accumulation de molécules ionisées instables dans la matière vivante favorisent la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) via la décomposition de molécules d'eau au cours d'un processus appelé la **radiolyse de l'eau**. L'augmentation considérable de ces radicaux libres instables de type  $O_2^{\bullet -}$ ,  $H^{\bullet}$ ,  $HO^{\bullet}$  au sein du tissu irradié induit d'importants dommages moléculaires et cellulaires. Au niveau membranaire les ROS vont engendrer des changements structuraux et conformationnels des composants cellulaires majeurs dont les protéines et les lipides (peroxydation lipidique) (Poli et al. 1997). Ces modifications peuvent ainsi conduire à leur inactivation (perte de la fonction biologique) ou au contraire, peuvent dans certains cas activer des récepteurs membranaires comme le récepteur au TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ ) ou des voies de signalisation via l'activation des radeaux lipidiques riches en céramides par exemple (Gulbins et al. 2003).

D'un point de vue moléculaire, les rayonnements ionisants sont capables d'induire directement ou indirectement des dommages à l'ADN (**Figure 2A**). Ces lésions sont les plus graves en termes de conséquences directes sur la fonction cellulaire. Les cellules mammifères sont capables d'enclencher trois mécanismes immédiats en réponse aux rayonnements : un arrêt de la progression du cycle cellulaire, la mise en place des mécanismes de réparation de l'ADN et la mort programmée (Turesson et al. 2003). Il est établi depuis longtemps que les dommages induits par les rayonnements ionisants dépendent de la phase du **cycle cellulaire** dans laquelle se trouve la cellule au moment de l'irradiation. Chez les mammifères, le cycle cellulaire est divisé en quatre phases : la phase G1, la phase S, la phase G2 (interphase), la phase M (division cellulaire), la phase G0 étant un état de quiescence (**Figure 2B**). L'apparition de cassures à l'ADN induit un arrêt temporaire du cycle en phase G1, S ou G2 au niveau de points de contrôle aussi appelés checkpoints. Il a de plus été montré que des cellules irradiées pendant les phases G2 et M sont plus radiosensibles que des cellules irradiées pendant la phase G1 et la phase S tardive (Bismar et al. 2002). En d'autres termes, les cellules ayant une importante activité mitotique sont plus radiosensibles que les cellules quiescentes.



**Figure 2** : Conséquences cellulaires des rayonnements ionisants : (A) Effets directs et indirects des rayonnements ionisants sur l'ADN ; (B) Etapes du cycle cellulaire impactées après irradiation.

En terme d'atteintes moléculaires, les RI génèrent plus de vingt types différents de dommages à l'ADN. Parmi les plus fréquents, on distingue les altérations de bases nucléotidiques (oxydation ou perte de base) réparées par excision-resynthèse ; les cassures simple brin réparées rapidement par complémentarité de bases; les cassures double brin sont réparées par recombinaison homologue mais peuvent être à l'origine d'une perte de l'information génétique ; les pontages inter ou intra-brin d'ADN ou ADN-protéine qui empêchent la réplication de l'ADN. Toutefois, les cassures double brin sont identifiées comme les dommages à l'ADN les plus importants en terme d'impact sur la survie cellulaire, avec environ 25 à 50 cassures double brin générées pour une dose de 1 Gy (low-LET), dont 1 à 2% ne sont pas réparées et sont donc létales (Turesson et al. 2003). Ce type de dommage est généralement corrélé avec la présence de foci  $\gamma$ -H<sub>2</sub>AX (Histone H2A de la famille X) dans le noyau. Lorsque les mécanismes de réparation ne parviennent pas à résorber ces altérations, la cellule rentre dans un processus de mort programmée ou **apoptose**.

Enfin, dans certains cas la présence d'aberrations chromosomiques est à l'origine de la formation de chromosomes acentriques, dicentriques ou encore de micronoyaux qui favorisent la mort clonogénique des cellules après 1 à 2 cycles (Turesson et al. 2003). Les rayonnements ionisants engendrent également de nombreuses lésions à l'ADN individuelles (cassures simple brin) qui lorsqu'elles sont proches dans l'espace, peuvent générer des dommages complexes regroupés sous le terme de clusters (Prise et al. 2005). La reconnaissance et la

résorption de ce type de dommage par les mécanismes de réparation restent complexes. De façon générale, ces modifications chromosomiques engendrent une perte massive de l'information génétique au moment de la division cellulaire et sont étroitement liées au processus **de mort mitotique** (Prise et al. 2005). De plus, on sait aujourd'hui que la complexité des dommages engendrés après irradiation dépend également du type de particules utilisées. Par exemple, les particules  $\alpha$  génèrent plus de lésions complexes de type clusters que les rayons de type X ou  $\gamma$ .

L'ensemble de ces paramètres sont à prendre en compte dans l'efficacité de la radiothérapie qui vise en premier lieu la destruction des cellules tumorales qui possèdent une activité mitotique plus élevée que les cellules saines. Dans les années 1980 un algorithme mathématique appelé le **modèle linéaire-quadratique** (LQ), a été développé afin de prédire la radiosensibilité tissulaire aux rayonnements. Ce modèle de référence permet de définir un rapport  $\alpha/\beta$ , où  $\alpha$  et  $\beta$  sont deux constantes spécifiques à un type cellulaire donné, pouvant varier en fonction du type d'irradiation et de la dose (Turesson et al. 2003). Ce rapport détermine l'effet biologique de l'irradiation sur le tissu et identifie la dose nécessaire pour optimiser l'action délétère des RI sur la tumeur, tout en préservant au maximum les tissus sains (notion de balance bénéfique/risque). Il peut être modélisé à partir de courbes de survie de différents types cellulaires qui seraient le reflet de la réponse tissulaire aux rayonnements (Hill et al. 2001). Dans le cas des protocoles fractionnés, cette équation doit être modifiée et la valeur du rapport  $\alpha/\beta$  devient inversement proportionnelle à la radiosensibilité du tissu. Ainsi, il apparaît que les tissus à réponse rapide (épithéliums) sont peu sensibles au fractionnement (valeur du rapport  $\alpha/\beta$  élevée,  $> 10$  Gy), contrairement aux tissus à réponse tardive (mésenchyme) qui possèdent un rapport  $\alpha/\beta$  compris entre 1 et 3 Gy. Un exemple particulier concerne le carcinome de la prostate qui présente un faible rapport  $\alpha/\beta$  (1,5 Gy). Dans ce cas, une dose plus élevée par fraction comprise entre 4 et 5 Gy s'avère plus efficace en terme de gain thérapeutique qu'une fraction classique de 2 Gy (valeur proche du rapport). De manière générale, le modèle LQ permet de fournir une description globale des effets du fractionnement sur un tissu donné, valable pour des doses par fraction allant jusqu'à 6 Gy (Tucker et al. 2010). Il devient toutefois nécessaire d'augmenter la dose lorsque la valeur du rapport  $\alpha/\beta$  est proche de la valeur de la dose délivrée par fraction (Shorr et al. 2010). Bien que le modèle LQ ait permis des avancées majeures dans la mise en place des protocoles de radiothérapie, de nouvelles études sur sa fiabilité sont actuellement en cours d'essais cliniques

concernant l'utilisation de nouvelles techniques faisant intervenir des doses plus élevées par fraction (8 à 20 Gy) dans le cas des radiothérapies hypofractionnées et stéréotaxiques, ou au contraire concernant les faibles doses.

## 2. La radiothérapie : un outil clef dans le traitement des cancers

D'après les chiffres de l'Institut National du Cancer, environ 355 000 nouveaux cas de cancers ont été diagnostiqués en France pour l'année 2014. Ce chiffre est en constante progression et s'explique par une meilleure sensibilisation de la population aux campagnes de dépistage des cancers, soutenues par le Plan Cancer 2014-2019. La moitié de ces nouveaux cas diagnostiqués concerne des tumeurs de la sphère abdomino-pelvienne telles que le cancer de la prostate, le cancer de la vessie, le cancer du col de l'utérus ou encore le cancer colorectal. Pour la moitié de ces patients, le traitement fait appel à l'utilisation de la radiothérapie seule ou en association avec une chimiothérapie ou une chirurgie.

### a. Applications en radiothérapie : de l'Histoire à aujourd'hui

L'utilisation de la radiothérapie a fait suite aux travaux novateurs de Pierre et Marie Curie au cours des années 1867-1934 avec la découverte du radium et du polonium. Par la suite, l'utilisation du césium (césium 137,  $^{137}\text{Cs}$ , rayonnement  $\beta$ ) et du cobalt (cobalt 60,  $^{60}\text{Co}$ , rayonnement  $\gamma$ ) a prédominé avant d'avoir été détrônée dans les années 1940 par l'arrivée des accélérateurs de particules (rayons X), utilisés jusqu'à aujourd'hui en médecine. Il existe plusieurs techniques de radiothérapie qui tiennent compte des paramètres suivants : le type de tumeur à traiter, sa localisation (accessibilité), sa taille (extension tumorale) et aussi de l'état général du patient au moment du traitement et des symptômes associés.

La radiothérapie peut être utilisée dans trois objectifs distincts (i) tout d'abord à des fins **curatives**, le but dans ce cas précis étant le contrôle voire la stérilisation tumorale ; (ii) en soins **palliatifs** lorsque la pathologie est trop avancée ou métastatique ; (iii) et enfin à des fins **symptomatiques** pour soulager un symptôme majeur délétère pour le patient. On distingue aujourd'hui deux principales formes de radiothérapie, la radiothérapie externe où la source est placée à l'extérieur du corps du patient, et la radiothérapie interne où la source est placée

pendant une durée limitée dans le corps du patient au plus proche de la tumeur. Les différentes techniques de radiothérapie sont présentées en **Annexe 1**.

La **radiothérapie externe** est la plus utilisée en routine. Le protocole classiquement appliqué consiste à délivrer une dose de 10 Gy par semaine à raison de cinq séances de 2 Gy par jour ([Hennequin et al. 2006](#)). La dose totale varie entre 30 à plus de 70 Gy selon les types de cancers. L'amélioration des outils informatiques et d'imagerie permettent d'intégrer la notion de 3 dimensions et assurent un meilleur détournement de la zone à traiter (**Tableau 1**). De fait, la radiothérapie conformationnelle-3D (3D-CRT) s'est imposée en routine et permet la visualisation de la tumeur par imagerie scanner et l'adaptation au volume à traiter. D'autres techniques font intervenir une variation de l'intensité des faisceaux dans un même champ (irradiation conformationnelle avec modulation d'intensité, IMRT). Ceci permet notamment de faire varier la répartition de la dose et augmente la précision balistique. L'introduction dans la pratique clinique de systèmes d'imagerie embarquée (radiothérapie guidée par l'image, IGRT) permet de vérifier la position exacte du volume tumoral et des organes à risque avant et pendant l'irradiation (**Tableau 1**).

<b>Radiothérapie conformationnelle tridimensionnelle (3D-CRT)</b>	La plus communément utilisée. Augmentation de la précision d'irradiation via la reconstitution du volume tumoral et une meilleure délimitation des tissus sains grâce à l'imagerie scanner 3D
<b>Radiothérapie par modulation d'intensité (IMRT)</b>	Modulation de l'intensité des faisceaux au cours du traitement en fonction de la forme et du volume tumoral
<b>Radiothérapie stéréotaxique/radiochirurgie</b>	Permet l'irradiation d'un volume de petite taille avec une précision millimétrique. Le traitement peut être délivré en une fois (radiochirurgie) ou en quelques fractions (irradiation stéréotaxique). Système robotisé CyberKnife®)
<b>Radiothérapie guidée par l'image (IGRT)</b>	Permet grâce à l'imagerie de prendre en compte les déformations du volume cible entre les fractions et pendant l'irradiation. Comprend la tomographie à géométrie conique (CBCT) ; CyberKnife® ; la tomographie hélicoïdale

**Tableau 1 : Les principales techniques de radiothérapie externe.**

Quelle que soit la technique de radiothérapie appliquée, l'objectif consiste à délivrer une quantité de dose maximale sur une zone tumorale définie. Cette zone comprend la tumeur



solide (GTV, Gross Tumor Volume), et englobe également une marge de tissu sain non tumoral dite « marge de sécurité » qui pourrait contenir des extensions tumorales non visibles à l'imagerie (CTV, Clinical Target Volume). Enfin, le plan de traitement prend également en compte les incertitudes liées à la méthode de radiothérapie et les mouvements du patient (respiration par exemple), on parle de PTV (Planning Target Volume). L'évolution majeure des outils informatiques et des systèmes d'imagerie ces dernières années a permis une amélioration considérable de la balistique et la réduction de la toxicité radio-induite. Des études par méta-analyse permettent de relier la toxicité radio-induite observée chez les patients en fonction du type de radiothérapie utilisée. Par exemple, pour trente-cinq patients atteints d'un cancer de la prostate traités par radiothérapie 3D-CRT, IMRT et par proton thérapie (Proton Beam RadioTherapy, PBRT), pour une dose totale d'au moins 74 Gy, les résultats obtenus ont confirmé que (i) le taux de toxicité est proportionnel à la dose totale reçue ; (ii) l'utilisation de l'IMRT et de la PBRT est associée à une plus faible toxicité gastro-intestinale en comparaison avec la 3D-CRT ([Ohri et al. 2012](#)).

#### **b. Pathologies secondaires associées à la radiothérapie**

Les effets secondaires aigus et tardifs associés à la radiothérapie sont aujourd'hui mieux identifiés en fonction du type de tissu et varient en fonction des patients pour un même traitement. Il est notamment établi que l'exposition de certains tissus sains aux rayonnements est associée à l'apparition de pathologies secondaires pouvant apparaître des mois ou des années après la radiothérapie. Par exemple, l'irradiation thoracique prescrite dans les cas des cancers du poumon, du sein, de cancer de la tête et du cou ou des lymphomes de Hodgkin peut favoriser certaines pathologies cardio-vasculaires secondaires pouvant entraîner des insuffisances cardiaques telles que l'athérosclérose, les coronaropathies, les péricardites et valvulopathies ou encore le développement de fibrose cardiaque ([Milliat et al. 2008a](#); [Weintraub et al. 2010](#); [Kim et al. 2013](#)). De même, une exposition pulmonaire aux rayonnements ionisants lors du traitement des cancers du poumon peut favoriser le développement de fibrose pulmonaire radio-induite tardive (6 à 12 mois) ([Ding et al. 2013](#)). Au niveau abdominal, la présence du tube digestif dans le champ d'irradiation peut aussi induire des pathologies secondaires comme la rectite radique ([Hennequin et al. 2006](#)). Enfin, des cancers radio-induits consécutifs à une irradiation thérapeutique ont également été observés chez certains patients. C'est par exemple le cas pour les cancers de la tête et du cou



où les survivants présentent un risque plus élevé de 0,3% de développer à long terme des sarcomes radio-induits. La dose totale et le volume irradié seraient des facteurs prépondérants dans l'apparition de ces cancers secondaires (Thiagarajan et al. 2014). En 2012, la parution d'un décret a permis la classification de vingt et un types de cancers radio-induits parmi lesquels ont été identifiés la leucémie myéloïde aiguë, les ostéosarcomes, le rétinoblastome ou encore le cancer de la thyroïde.

### 3. La toxicité radio-induite aux tissus sains

La toxicité aux tissus sains fait référence à l'irradiation de tissu non tumoral pouvant être corrélée avec l'apparition d'effets secondaires délétères. En effet, quelle que soit la technique de radiothérapie employée, les tissus sains présents dans le champ d'irradiation reçoivent de manière inévitable une dose de rayonnements à l'origine de dommages tissulaires plus ou moins importants (**Annexe 2**). Ces tissus sains irradiés sont considérés comme des **organes à risque** (OAR) dans le traitement des cancers et constituent la principale limite quant à la dose totale pouvant être délivrée à la tumeur. Parmi les OAR, on distingue les organes très radiosensibles tels que l'œil, les ovaires et les testicules, les organes moyennement radiosensibles comme l'intestin grêle, le côlon, le cœur, les poumons, et les organes peu radiosensibles tels que les os, les muscles et les gros vaisseaux (**Tableau 2**). En conséquence, des tissus sains cibles ont été identifiés pour chaque protocole de radiothérapie ainsi qu'une **dose et un volume** maximaux tolérés par les OAR sans induire des effets secondaires majeurs sur ces derniers. Par ailleurs, la connaissance de cette dose de tolérance s'avère indispensable dans la planification d'un traitement par radiothérapie. De plus, la tolérance fonctionnelle des OAR à l'irradiation dépend essentiellement de leur capacité à continuer à fonctionner en tant qu'entité et varie en fonction de leur organisation structurale. En effet, il est établi que les organes possédant une architecture en série (tube digestif, moelle épinière), sont beaucoup plus radiosensibles que les organes avec une structure en parallèle (poumons, rein, foie). Dans le cas des organes en série, la destruction des sous-unités fonctionnelles entraîne une altération la fonction de ces organes alors que la présence d'unités indépendantes caractéristiques de la structure en parallèle, autorise l'irradiation à forte dose pour des petits volumes (cas de la stéréotaxie pulmonaire).

	Organes/tissus	Conséquences
<b>Organes très radiosensibles/ lésions sévères pour des doses faibles</b>	<b>Œil/Cristallin</b>	Cataracte, survenue tardive 3 à 6 ans
	<b>Ovaire</b>	Stérilité et castration temporaire ou définitive
	<b>Testicule</b>	Stérilité temporaire ou définitive selon la dose
	<b>Rein</b>	Néphrite radique, fibrose
	<b>Foie</b>	Hépatite radique, fibrose
<b>Organes radiosensibles</b>	<b>Rectum</b>	Rectite radique, fibrose
	<b>Intestin grêle</b>	Grêle radique, perforation, fibrose
	<b>Côlon</b>	Sténose ou parfois perforation
	<b>Cœur</b>	Péricardite constrictive
	<b>Poumons</b>	Insuffisance respiratoire, fibrose
	<b>Moelle épinière</b>	Myélite radique
	<b>Peau</b>	Radiodermite
<b>Organes peu radiosensibles</b>	<b>Os</b>	Fragilité osseuse, fracture, ostéoradionécrose
	<b>Muscle</b>	Sclérose et rétraction musculaire
	<b>Gros vaisseaux</b>	Sténose responsable d'accidents ischémiques
	<b>Tissu conjonctifs</b>	Fibrose radique

**Tableau 2 : Principaux organes à risque en radiothérapie. D'après le Guide des Procédures en Radiothérapie Externe 2007, Cancérologie pour le Praticien 1986.**

Concernant les modalités de traitement, plusieurs paramètres ont été identifiés comme étant déterminants dans l'incidence et la sévérité des dommages induits aux tissus sains. Parmi eux, on distingue la dose totale reçue, la dose par fraction, le volume de tissu irradié, la durée du traitement ou encore l'administration concomitante d'une chimiothérapie ([Bentzen et al. 1994](#)). Dans ce dernier contexte, l'administration d'une chimiothérapie concomitante à une radiothérapie peut dans certains cas être associée à une cytotoxicité digestive. L'utilisation de molécules telles que l'actinomycine D, le 5-fluorouracil (5-FU), la bléomycine ou encore la doxorubicine est corrélée avec des dommages au niveau de l'épithélium intestinal ([Bismar et al. 2002](#)).

En 1994, Bentzen et Overgaard ont listé d'autres paramètres déterminants dans l'apparition des dommages radio-induits aux tissus sains ([Bentzen et al. 1994](#)). Tout d'abord, les facteurs dits extrinsèques qui regroupent les facteurs associés aux patients dit

**radiosensibilité interindividuelle**, et les **facteurs de comorbidité** faisant référence à la présence de pathologies préexistantes. Il est par exemple avéré que l'âge des patients au moment du traitement constitue un paramètre important dans l'évolution des dommages radio-induits. Le traitement des cancers chez le jeune enfant est très souvent associé à des complications touchant le système nerveux central (SNC) ou les glandes endocrines. Chez les patients atteints de cancer pulmonaire, on observe une augmentation du risque de pneumopathies radio-induites sévères chez 34,4% chez des patients âgés de plus de 70 ans contre 18,2% pour des patients plus jeunes (Bentzen et al. 1994). L'indice de masse corporelle du patient est également un acteur prépondérant dont va dépendre l'efficacité du traitement. Des patients possédant un indice de masse corporelle élevé (obésité établie) ont un risque moins élevé de développer une toxicité radio-induite que les patients avec une faible masse corporelle (Fuccio et al. 2015). De même, le tabagisme des patients au moment de la radiothérapie représente un facteur de risque dans l'évolution des lésions tissulaires dans le cas de cancers de la tête et du cou. Le statut physiologique du patient est à prendre en compte au moment du traitement. Ainsi il a été établi l'existence d'un lien entre la morbidité observée chez certains patients et la présence de certains éléments étiopathologiques tels que le diabète mellitus, l'hypertension, les maladies inflammatoires chroniques du tube digestif (maladie de Crohn ou Rectocolite Hémorragique) ou encore des maladies héréditaires du collagène. On parle dans ce cas de facteurs de comorbidité (Bentzen et al. 1994). De manière plus générale, il est important de souligner que la présence de ces facteurs de prédisposition ne modifie pas fondamentalement la cytotoxicité des rayonnements mais interviendrait dans une ou plusieurs étapes du processus pathologique. Enfin, la prédisposition génétique de chaque patient explique en grande partie la variabilité dans l'apparition et le développement des lésions radio-induites pour un même traitement. L'existence de facteurs de prédisposition génétique (identifiés comme des **facteurs intrinsèques**) a été proposée suite à l'observation d'hypersensibilité sévère aux rayonnements ionisants chez des patients atteints de syndromes héréditaires comme l'Ataxie Telangiectasie. Cette pathologie a pour origine la présence de mutations dans les gènes essentiels dans la réparation de l'ADN (comme le gène ATM, Ataxia Telangiectasia Mutated) et est associée à des phénomènes d'hyper-radiosensibilité (Bentzen et al. 1994; Hill et al. 2001).

Ces dernières années, l'amélioration des outils informatiques et des systèmes d'imagerie médicale ont contribué à une évolution considérable des techniques de radiothérapie. Ces progrès technologiques sont à la base de l'amélioration de la balistique et de la réduction du volume de tissus sains exposés. Toutefois, l'exposition des organes à risque demeure inévitable à ce jour. L'apparition d'effets secondaires délétères constitue la principale limite dans l'efficacité du traitement anti-tumoral, et entache la qualité de vie des patients avec dans certains cas, des conséquences létales au long terme. La réduction des dommages radio-induits aux tissus sains et la mise en place de stratégies thérapeutiques spécifiques en clinique représentent donc des enjeux futurs majeurs dans ce domaine.

## Chapitre 2. Dommages radio-induits aux tissus sains : cas du tube digestif

La moitié des traitements par radiothérapie en France concerne des tumeurs de la sphère abdomino-pelvienne. Dans ce contexte, des portions du tube digestif peuvent se retrouver dans le champ d'irradiation. Malgré les progrès effectués en balistique, la toxicité induite aux tissus sains reste inévitable et représente encore à ce jour la principale limite dans l'escalade de dose pouvant être délivrée au tissu tumoral et donc, une limite dans l'efficacité du traitement en général. L'iléon terminal, le côlon ou encore le rectum sont considérés comme des OAR dans le traitement du cancer cervical, endométrial, rectal ou prostatique et peuvent être à l'origine du développement de pathologies secondaires chroniques. Aujourd'hui, l'enjeu majeur en clinique est d'assurer la destruction tumorale tout en limitant la dose et le volume de tissus sains irradiés. Cet aspect est défini par la notion de balance bénéfice/risque.

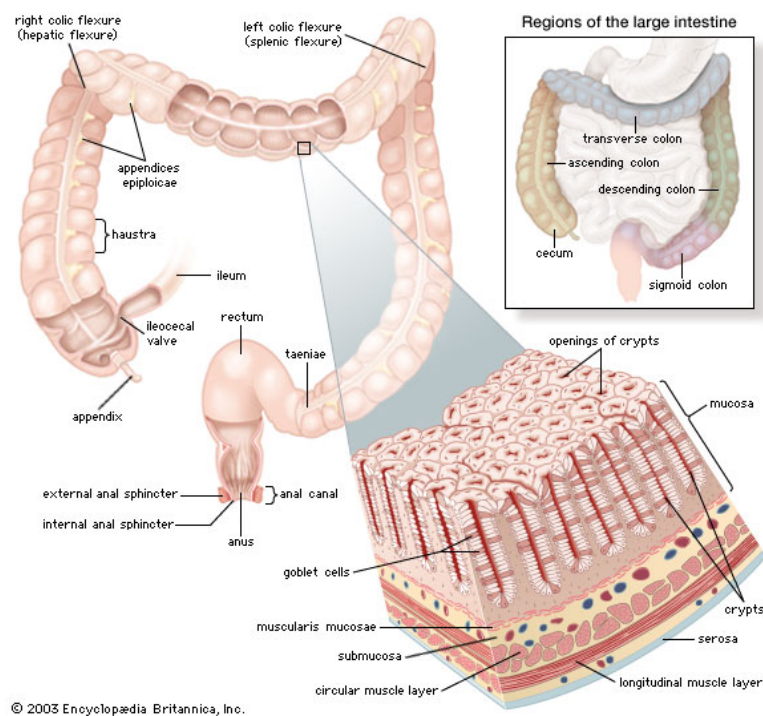
### 1. Structure et fonctions du tube digestif chez l'Homme

L'intestin se compose de manière schématique en deux compartiments: (i) l'intestin grêle, lui-même subdivisé en trois parties (selon un axe cranio-caudal) le duodénum, le jéjunum et l'iléon permettant la majorité de l'absorption des nutriments par l'épithélium intestinal ; (ii) le gros intestin, comprenant le cæcum, le côlon puis le rectum dans lesquels se poursuit la digestion et s'effectuent les dernières absorptions d'eau et d'électrolytes. La structure particulière de l'intestin associée à un système vasculaire dense explique en partie sa radiosensibilité (Potten 1977; Maj et al. 2003). Dans le contexte de cette étude, nous nous sommes principalement concentrés sur les dommages radio-induits au niveau du côlon et du rectum. Seules l'anatomie et les fonctions de ces organes seront donc abordées de manière détaillée dans la suite de ce chapitre.

Le côlon constitue la partie terminale de l'appareil digestif. Il se compose de quatre parties: la première en partant du cæcum est le **côlon ascendant** suivie du **côlon transverse**, puis du **côlon descendant** et la partie terminale, le **côlon sigmoïde (Figure 3)**. Le rectum se situe en aval du côlon sigmoïde et comprend l'ampoule rectale et le canal anal à son extrémité. D'un point de vue physiologique les principales fonctions du côlon sont d'assurer le stockage puis l'élimination des déchets biologiques. C'est au niveau du côlon que

s'effectue la digestion finale du chyme alimentaire grâce à la présence d'un microbiote riche ( $10^{11}$  à  $10^{12}$  bactéries) permettant la dégradation de certaines fibres (dégradation enzymatique des polysaccharides complexes par la flore bactérienne). C'est également au niveau du côlon que s'effectue en majorité l'absorption de l'eau et des électrolytes et aussi l'absorption de certaines vitamines essentielles telles que la vitamine K (vitamine liposoluble nécessaire pour la modification post-traductionnelle de certaines protéines de la coagulation par exemple).

D'un point de vue histologique le côlon est composé de cinq tuniques. On distingue selon un axe lumière intestinale - séreuse : la muqueuse qui regroupe l'épithélium colique et le chorion (base des cryptes). La muqueuse comprend un important réseau microvasculaire permettant l'irrigation en profondeur et l'apport nécessaire en oxygène aux cellules de la crypte ainsi qu'un réseau lymphatique via les canaux chylifères. La muqueuse repose sur une musculaire muqueuse elle-même appuyée sur une sous-muqueuse. On distingue ensuite la musculature qui comprend les couches musculaires circulaires interne et longitudinale externe assurant les mouvements péristaltiques. Enfin, la tunique la plus externe est la séreuse (associée au péritoine viscéral) qui est composée de tissu adipeux, d'un mésothélium et de vaisseaux sanguins de diamètre important.



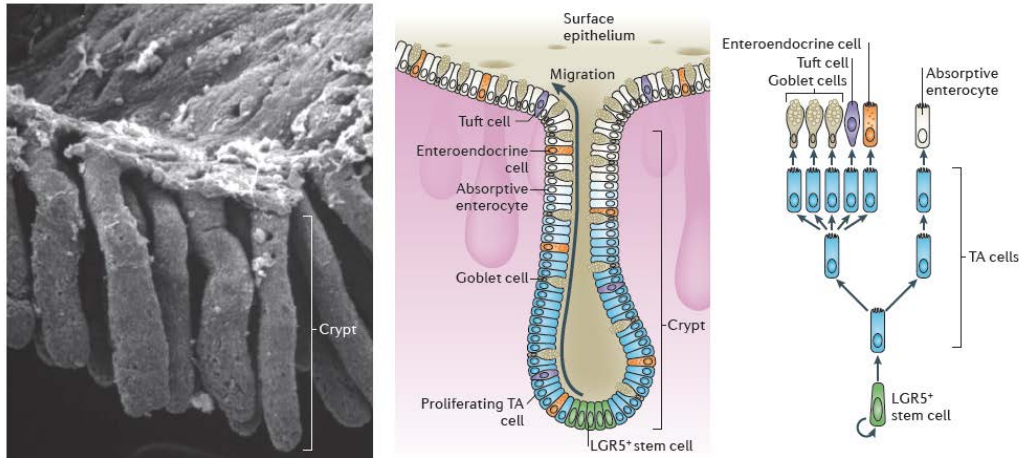
**Figure 3 : Organisation fonctionnelle du côlon chez l'Homme.**

La composition cellulaire particulière de la muqueuse colorectale lui confère ses propriétés biologiques caractéristiques. Elle comprend un épithélium colique ponctué d'invaginations tubulaires droites appelées cryptes ou glandes de Lieberkühn (**Figure 4**). On dénombre environ 250 cellules par crypte et leur organisation est généralement uniforme au sein d'une région donnée du tractus digestif ([Booth et al. 2000](#)). Quatre types cellulaires ont été identifiés et sont répartis dans des régions spécialisées de la crypte. On distingue ainsi deux compartiments dans une crypte : un compartiment prolifératif et un compartiment fonctionnel ([Joubert et al. 2009](#)).

Le **compartiment prolifératif** situé à la base des cryptes est essentiellement composé de cellules souches et de cellules immatures. On compte environ quatre à six cellules souches par crypte ([Marshman et al. 2002](#)). Ces dernières sont caractérisées par un phénotype pluripotent, c'est-à-dire qu'elles sont capables à la fois de se diviser en cellules filles progénitrices qui assurent le renouvellement épithélial ; mais également de générer des cellules filles immatures qui maintiennent le pool de cellules souches à la base des cryptes. Pendant longtemps, il a été difficile de caractériser les cellules souches intestinales dû à un manque de marqueurs spécifiques pour ce type cellulaire. C'est en 2007 que les travaux de Barker *et al* ont pu identifier une première population de cellules souches exprimant **Lgr5<sup>+</sup>** (Leucin-rich repeat-containing G-protein coupled receptor 5 ou Gpr49), un gène cible de la voie Wnt ([Barker et al. 2007](#)). Ces auteurs ont montré par technique d'hybridation *in situ*, l'expression exclusive de Lgr5 par une population de cellules mitotiquement actives au fond des cryptes. Un an plus tard, une seconde population **Bmi1<sup>+</sup>** (B lymphoma Mo-MLV Insertion region 1 homolog) est mise en évidence par Sangiorgi *et al* ([Sangiorgi et al. 2008](#)). Ces deux populations se différencient entre autres par une position différente au sein de la crypte et également par une différence dans l'activité du cycle cellulaire. Les cellules Lgr5<sup>+</sup> sont localisées au fond des cryptes, on parle de CBC pour Crypt Base Columnar cells, alors que les cellules Bmi1<sup>+</sup> sont retrouvées en position + 4. Les cellules Lgr5<sup>+</sup> sont mitotiquement actives et de fait plus radiosensibles, alors que les cellules Bmi1<sup>+</sup> sont identifiées comme quiescentes et radiorésistantes pour des fortes doses (12 Gy en corps entier) ([Barker et al. 2007](#); [Yan et al. 2012](#)). Zhu *et al* ont récemment pu montrer que 40% des cellules apoptotiques des cryptes sont Lgr5<sup>+</sup> ([Zhu et al. 2013](#)). Au cours du processus de maturation, les cellules souches migrent vers le centre de la crypte et prolifèrent au sein d'un compartiment dit de «transition et d'amplification» (Transit-Amplifying, TA) ([Barker 2014](#)). Les cellules en prolifération



poursuivent ensuite leur migration vers la lumière et se différencient en cellules épithéliales fonctionnelles. Les cellules épithéliales présentes au pôle apical se détachent de la lame basale et sont éliminées de l'épithélium bordant par anoïkis.



**Figure 4 : Unité fonctionnelle de la muqueuse colorectale, la crypte de Lieberkühn.**  
(d'après Barker *et al.* 2014)

**L'épithélium colique fonctionnel** se compose principalement de 3 types cellulaires distincts. On retrouve de façon majoritaire les **cellules cylindriques** ou **côlonocytes** qui composent l'épithélium bordant et assurent l'absorption des nutriments et des électrolytes. La sécrétion constante de mucus est assurée par les **cellules caliciformes** ou **goblet cells**. Ces dernières sont chargées en granules intracytoplasmiques essentiellement composés de mucines qui permettent d'une part la lubrification de la muqueuse et donc l'avancée du contenu intestinal et d'autre part une protection physique contre les bactéries et les molécules de grande taille présentes dans la lumière intestinale. L'absorption de nutriments par les cellules coliques stimule la synthèse d'hormones et autres peptides tels que la sérotonine, le glucagon, la substance P ou encore la gastrine par les **cellules entéroendocrines**. Ces cellules sont peu nombreuses et représentent environ 1% des cellules de la crypte (Gerbe *et al.* 2012). Contrairement à l'intestin grêle, les cellules de Paneth sont absentes des cryptes de l'épithélium colique et peuvent quelques fois être observées au niveau du côlon ascendant dans certaines pathologies (Humphries *et al.* 2008). Ces dernières possèdent une activité sécrétrice importante associée à une activité enzymatique antimicrobienne. Enfin, on



distingue également les « **tuft cells** » qui représentent environ 0,4% des cellules épithéliales intestinales. Bien que ces cellules aient été découvertes depuis plus de soixante ans, leurs fonctions précises restent à ce jour indéterminées (Gerbe et al. 2012). Enfin, la fonction de cet épithélium colique est assurée par le renouvellement continu et rapide des différents types cellulaires qui le composent. Ce renouvellement est assuré en 3 à 5 jours chez l'Homme (Maj et al. 2003).

## 2. L'intestin : un organe radiosensible

La structure particulière de l'intestin et l'importante activité mitotique des cellules souches intestinales explique en partie sa radiosensibilité (Bismar et al. 2002). Cette importante activité mitotique place ce compartiment souche en première ligne dans la cinétique des dommages radio-induits, et explique en majeure partie les symptômes aigus observés en clinique. Il est en effet établi que la mort des cellules du compartiment souche est un événement clef dans l'initiation des dommages radio-induits associée à une perte des principales fonctions biologiques intestinales. La présence d'un réseau microvasculaire dense au sein de la muqueuse contribue également à la radiosensibilité de cet organe (Maj et al. 2003).

### a. Dommages radio-induits à l'intestin

L'**entérite radique** est décrite comme l'ensemble des dysfonctions de l'intestin grêle consécutives à une irradiation pelvienne. Il est aujourd'hui établi que la fréquence et l'intensité de l'entérite radique sont directement fonction de la dose totale reçue par le tissu et du volume irradié. Elle est observée pour des doses totales de 40 Gy et la sévérité des lésions augmente sérieusement pour des doses excédant 50 Gy (Bismar et al. 2002). De par sa localisation proche de la prostate, la paroi antérieure du rectum se retrouve de manière inévitable dans le champ d'irradiation au cours des traitements des tumeurs prostatiques par radiothérapie (Leiper et al. 2007). Le rectum constitue donc un OAR critique dans l'irradiation forte dose de ce cancer (Annexe 2). Les lésions radio-induites à cet organe sont regroupées sous le terme de **rectite radique** ou « radiation proctitis ». Un des symptômes le plus fréquemment observé et indicateur de cette pathologie est la présence de saignements rectaux. Une étude rétrospective menée chez 465 patients a récemment montré que

l'apparition des saignements était observée dans 94,3% des patients au cours des deux premières années suivant la radiothérapie (Schreiber et al. 2014). L'installation de la pathologie favorise la formation de néovaisseaux aberrants (télangiectasies) et dans les cas les plus avancés, l'installation d'une fibrose favorise la perte de tonicité tissulaire, souvent associée à une persistance de l'ulcération muqueuse (Leiper et al. 2007).

En clinique, l'atteinte digestive est caractérisée par des symptômes sévères invalidants pour les patients. La cinétique d'apparition de ces séquelles a permis de classer les complications digestives radio-induites en fonction de leur période d'apparition (Theis et al. 2010). On distingue ainsi :

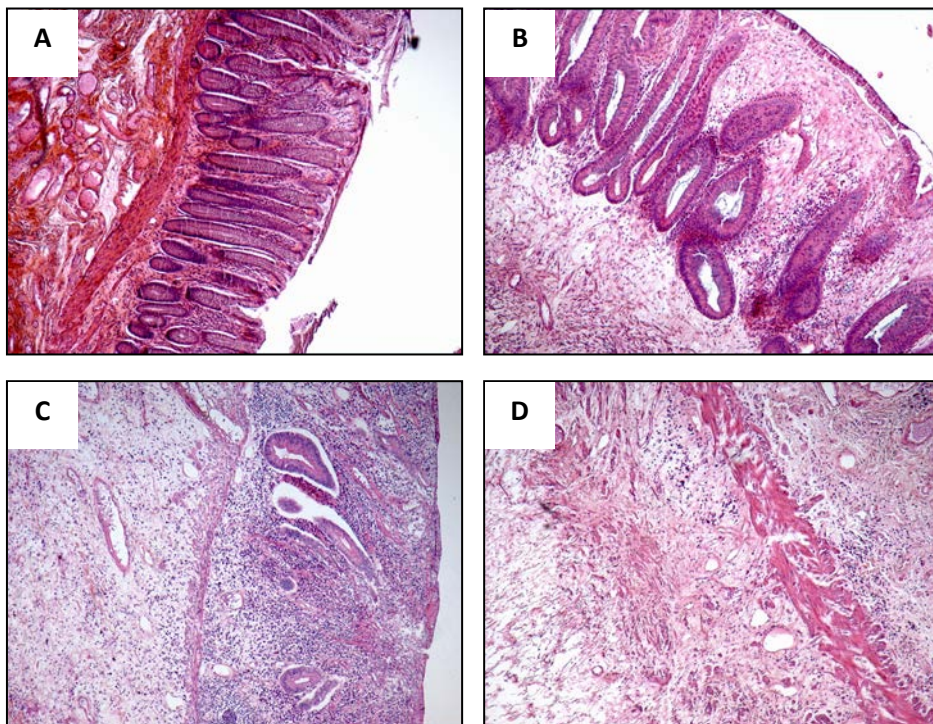
Les complications aiguës : celles-ci surviennent dès la première semaine de radiothérapie et apparaissent au cours des trois premiers mois qui suivent le début du traitement. L'entérite aiguë est caractérisée par une stérilisation partielle du compartiment souche situé à la base des cryptes. L'absence de renouvellement épithélial et l'inflammation radio-induite participent à l'ulcération progressive de la muqueuse digestive. L'ensemble de ces dysfonctions sont responsables d'une rupture de la barrière intestinale associé à des phénomènes de malabsorption et de fuites d'électrolytes. En clinique les patients souffrent d'importantes douleurs abdominales ou encore de fréquentes diarrhées. Ces atteintes sont observées chez 60 à 80% des patients et sont réversibles dans la majorité des cas (Bismar et al. 2002).

Les complications chroniques ou tardives : la période d'apparition des symptômes est plus variable que pour les effets aigus. Elle peut débuter au-delà des trois premiers mois suivant la fin du traitement et peut s'étendre jusqu'à plusieurs années après celui-ci (jusqu'à plus de 30 ans). Les séquelles tardives sont caractérisées par un processus inflammatoire et cicatriciel chronique et une fibrose tissulaire transmurale. Ces complications sont retrouvées chez 5 à 10% des patients (Andreyev et al. 2011). En clinique, ce type de complication se décrit par une importante perte de poids, des douleurs abdominales sévères pouvant être dues à des occlusions digestives partielles (sténose due à la fibrose radique) ou encore des nausées et des vomissements pouvant traduire des problèmes de malabsorption.

#### **b. Conséquences tissulaires des rayonnements : cas du rectum**

Au niveau histologique, le rectum sain présente une architecture bien définie avec une distinction claire des différents compartiments qui le composent (**Figure 5A**). L'irradiation

induit des dommages muqueux observés de manière précoce (phase aiguë) correspondant à déstructuration profonde de la muqueuse. Ces dommages aigus sont principalement dus à la vague de mort précoce des cellules souches épithéliales entraînant une dénudation épithéliale. L'activation du compartiment vasculaire régit la réponse inflammatoire précoce. Selon la dose et le stade d'avancement de la pathologie, certaines reprises glandulaires (cryptes hyperplasiques) sont observées, signe d'une prolifération accrue des cellules épithéliales et d'une tentative de reconstruction muqueuse (**Figure 5B**). La mise en place de la réponse inflammatoire muqueuse est caractérisée par une raréfaction plus ou moins sévère des cryptes et une infiltration dense de la lamina propria par des cellules immunitaires (neutrophiles, macrophages et lymphocytes, **Figure 5C et D**). La rupture de la barrière épithéliale favorise la fuite d'électrolytes et l'augmentation de la perméabilité aux pathogènes présents dans la lumière intestinale. Ceci exacerbe la réponse inflammatoire dont l'activation chronique favorise activement le développement de lésions tardives.



**Figure 5 :** Histopathologie de la rectite radiée chez l'Homme. Résections chirurgicales 5 à 7 semaines après radiothérapie préopératoire pour adénocarcinome rectal, dose totale de 45 Gy. A : tissu sain, B, C et D : tissus pathologiques. Coloration Hémalum/Eosine/Safran (HES); obj x 40 (d'après François *et al.* 2013).

Pour des lésions plus tardives, il existe une infiltration de collagènes dans le compartiment sous-muqueux qui peut s'étendre à la musculaire et à la séreuse (fibrose

transmurale). Le dépôt excessif de collagènes traduit une activation soutenue du compartiment mésenchymateux, acteur clef dans l'installation de la fibrose transmurale. Alors que l'on pensait que la fibrose tissulaire était figée et offrait donc peu d'opportunités thérapeutiques, on sait maintenant que la fibrose tissulaire est un phénomène dynamique et évolutif. Comprendre ses mécanismes est essentiel pour ouvrir le champ des possibilités thérapeutiques.

### **3. Gestion clinique actuelle des séquelles digestives radio-induites**

Les stratégies thérapeutiques actuelles pour traiter les complications digestives radio-induites sont essentiellement symptomatiques. Les principaux essais cliniques menés jusqu'à aujourd'hui ont porté sur trois domaines d'action : (i) l'utilisation de traitements anti-inflammatoires, (ii) l'utilisation de traitements antioxydants, (iii) des thérapies vasculaires avec l'utilisation de molécules vasculotropes, et les traitement en chambre hyperbare pour les lésions sévères ([Hauer-Jensen et al. 2014](#)). Il est à noter que l'utilisation de ces thérapies doit se faire en tenant compte du stade évolutif de la pathologie à savoir, s'il s'agit d'une fibrose jeune et inflammatoire ou bien d'un bloc fibreux associé à des lésions anciennes et établies. Aujourd'hui le pronostic d'évolution des entérites radiques reste dans l'ensemble mauvais et évolue dans la majorité des cas vers un syndrome occlusif persistant et récurrent associé à une issue létale dans 10% des cas ([Hauer-Jensen et al. 2003](#); [Larsen et al. 2007](#)).

#### **a. Gestion clinique des dommages aigus**

Les antibiotiques : Ces moyens thérapeutiques visent avant tout à prévenir les infections bactériennes pouvant survenir suite à une intervention chirurgicale ou dans le cas de perforations intestinales. L'utilisation d'antibiotiques reste empirique et son efficacité dans la diminution des lésions radiques serait variable en fonction des patients ([Theis et al. 2010](#)).

Les anti-diarrhéiques : Les symptômes de type diarrhées sont traités avec des anti-diarrhéiques classiques (lopéramide, codéine phosphate), ou par l'utilisation de peptide de synthèse (octréotide). D'autres analogues de la somatostatine sont envisagés lorsque ces premiers traitements s'avèrent inefficaces. Ces moyens thérapeutiques visent à diminuer les sécrétions de la muqueuse et à ralentir le péristaltisme intestinal ([Theis et al. 2010](#)). Malgré

une amélioration de l'état du patient, la cessation de ces traitements est couramment associée avec la reprise des symptômes.

Les anti-inflammatoires : L'utilisation de corticostéroïdes tels que les aminosalicylates favorise la réduction de l'entérite radique aiguë, bien qu'il existe des effets secondaires associés à cette thérapie (Theis et al. 2010). L'utilisation de stéroïdes (injections en intramusculaire de triamconolone acétonide, tous les 10 jours) permet de prévenir le développement de lésions aiguës sans effets secondaires majeurs (Cetin et al. 2014). Ces stratégies apparaissent prometteuses et d'autres études sont nécessaires pour valider ces résultats au long terme.

Les antioxydants : La majorité des lésions radio-induites étant dues à la production de ROS dans les tissus irradiés, l'utilisation de drogues limitant leur production ou favorisant leur séquestration constitue une approche d'intérêt. Bien que son utilisation soit associée avec des effets secondaires gênants (nausées, vomissements, hypotension) l'amifostine est un agent organique cytoprotecteur couramment utilisé en clinique. Il s'agit d'une prodrogue dont la forme activée (déphosphoration par la phosphatase alcaline) pénètre dans les cellules saines et leur confère une protection contre la toxicité radio/chimio-induite en capturant les radicaux libres générés (Bismar et al. 2002). Malgré son efficacité chez l'animal et en clinique, son utilisation reste à ce jour controversée due à un éventuel effet protecteur sur les cellules tumorales et l'apparition d'effets secondaires importants (hypotension, nausées, prurit) (Fuccio et al. 2015). D'autres travaux ont pu montrer que l'administration de vitamine E (radioprotecteur non-toxique naturel le plus puissant) en combinaison avec la pentoxifylline (PTX, vasodilatateur) était associée avec une amélioration des symptômes des patients (Hamama et al. 2012). Enfin, la superoxyde dismutase (SOD) et d'autres mimétiques de cette enzyme représentent de la même manière des stratégies antioxydantes (Delanian et al. 1994; Delanian et al. 2001). Il a notamment été montré que la surexpression de la SOD2 dans un modèle d'irradiation *in vitro* augmente la capacité de réparation de l'ADN et est associée avec la diminution d'expression de diverses protéines pro-apoptotiques telles que BAX, p38 et de la libération du cytochrome C par les mitochondries (Epperly et al. 2002).

#### **b. Gestion clinique des lésions chroniques**

Le sucralfate : Il s'agit d'un complexe de sulfate d'aluminium de sucrose dont l'efficacité repose sur sa capacité à former une couche visqueuse protectrice à la surface de la muqueuse

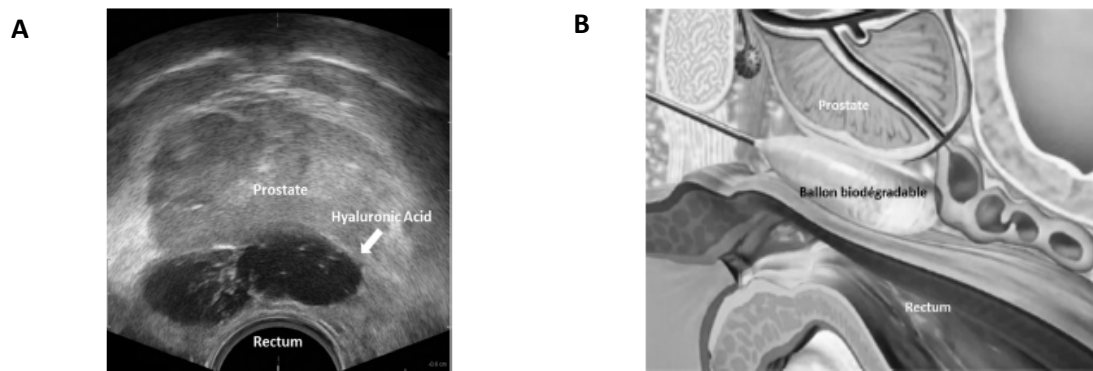
intestinale, ce qui favorise la cicatrisation de cette dernière en stimulant le processus d'angiogenèse. L'analyse des résultats obtenus au cours d'essais cliniques sont encourageants. Une réduction de la perte de mucus ainsi qu'une baisse de l'incontinence des patients ont été observées après la prise quotidienne de sucralfate (Fuccio et al. 2015). Cependant ces effets n'ont pas été observés dans l'ensemble des essais réalisés. C'est pourquoi, d'autres études s'avèrent nécessaires afin de valider l'effet bénéfique du sucralfate dans la gestion des effets secondaires tardifs radio-induits.

Oxygène Hyperbare : Ce type de thérapie consiste à limiter les dommages causés par l'hypoxie tissulaire générée par l'irradiation via la stimulation du processus d'angiogenèse, ceci en plaçant le patient dans une atmosphère chargée en oxygène. Les résultats obtenus chez les patients ont confirmé l'efficacité de cette technique (régénération tissulaire, diminution des radicaux libres et de la fibrose), cependant sa mise en place requière un certain coût et le nombre de centres proposant cette thérapie reste faible (Leiper et al. 2007; Fuccio et al. 2012).

Les interventions chirurgicales : Elles sont effectuées dans les cas les plus avancés de la pathologie : occlusion intestinale, présence de fistules ou de perforation de la muqueuse. Ces interventions sont à risque (possibilité d'adhésions péritonéales, risque de retard de cicatrisation ou de rupture de sutures après intervention chirurgicale) et sont appliquées en dernier recours.

Techniques innovantes : Ces nouvelles stratégies ont une visée préventive de la rectite radique et reposent sur l'insertion d'un « spacer biodégradable » dans la graisse périmrectale afin d'augmenter la distance entre le rectum et la prostate (espace rectoprostatique, **Figure 6**). Plusieurs types de spacers sont actuellement commercialisés et utilisés en clinique : hydrogel de polyéthylène-glycol (PEG), acide hyaluronique, collagène, ballon biodégradable (Zilli et al. 2014). Après analyse de la littérature, Zilli et al ont révélé que les premiers résultats obtenus avec l'utilisation de ces nouveaux outils sont très encourageants. En termes de gain dosimétrique, l'utilisation du gel de PEG est associée à une réduction du  $V_{70}$  rectal (volume rectal recevant au moins 70 Gy), de l'ordre de 45,9 à 61,4% et de 43 à 84% pour l'acide hyaluronique et de 55,3% pour le ballon.





**Figure 6 : Illustrations de deux techniques innovantes: (A) Visualisation de la position du spacer : acide hyaluronique et (B) ballon biodégradable (d'après Zilli *et al.* 2014).**

Une étude européenne de phase II a permis de montrer que chez cinquante-deux patients traités par IMRT (dose totale de 78 Gy), l'administration du gel de PEG est associée à une réduction significative du taux de rectite aiguë (grades 1 et 2), et de rectite chronique (grades 1 et 2), selon les critères du Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) et de la Radiation Therapy Oncology Group/European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC), voir **Annexe 3**. De plus, aucun cas de rectite de grade 3 et 4 n'a été observé chez ces patients. Enfin, il est à noter que le bénéfice observé avec l'utilisation de ces nouvelles techniques préventives subsiste quelle que soit la technique de radiothérapie utilisée (3D-CRT, IMRT, Arc Thérapie Volumique) pour des doses allant jusqu'à 80 Gy (Zilli *et al.* 2014). Cependant, malgré le réel effet bénéfique de ces techniques innovantes, leur utilisation reste encore limitée principalement due au coût de ces dernières.

#### **4. Toxicité digestive radio-induite : vers une meilleure compréhension des séquelles**

La toxicité digestive radio-induite a pendant une longue période été délaissée par les cliniciens et autres professionnels de santé (Andreyev *et al.* 2011). En effet, il apparaît que ces manifestations cliniques n'étaient pas considérées comme appartenant à une pathologie à part entière, mais plus comme une accumulation de symptômes vagues et non définis, dont l'impact psychologique et physique était mal évalué ou peu apprécié par les professionnels de santé. Aujourd'hui, il existe un effort réel dans la considération de cette pathologie pouvant

aussi s'expliquer par un nombre toujours plus important de survivants du cancer. On note une meilleure prise en compte des symptômes décrits par les patients qui sont observés de manière plus attentive : ces symptômes sont maintenant regroupés sous le terme de « **pelvic radiation disease** » (Andreyev et al. 2010). Cette évolution dans l'approche des effets secondaires des radiothérapies a permis de définir ces séquelles comme faisant partie d'un processus de pathogenèse à part entière. Cependant, la description de l'entérite radique souffre encore à ce jour d'imprécisions et le dialogue entre les radiothérapeutes, les médecins et les chercheurs doit se poursuivre dans ce sens pour aller vers une harmonisation de sa terminologie. Enfin, les mécanismes moléculaires et cellulaires régissant ce processus pathologique restent à être élucidés avec l'identification de cibles spécifiques pouvant ouvrir les possibilités thérapeutiques dans le futur.

## 5. Toxicité radio-induite : du concept de cellule cible à la réponse intégrée

Il est admis que les dommages tissulaires causés par les rayonnements vont dépendre de plusieurs paramètres. Par exemple, la dose totale reçue, le volume de tissu irradié, le protocole appliqué (dose par fraction, nombre total de fraction, durée entre chaque fraction, durée totale du traitement), la radiosensibilité et la nature de l'organe traité constituent un ensemble de critères à prendre en compte dans l'appréhension des dommages aux tissus sains.

### a. Le concept de la « cellule cible »

Une des premières hypothèses émise pour expliquer la toxicité gastro-intestinale a été décrite de façon formelle par le concept de « la cellule cible » dans les années 1940. Ce concept suggère que la réponse tissulaire aux rayonnements est orchestrée par la mort d'un type cellulaire crucial dit « cible » entraînant la dysfonction de l'organe touché. En d'autres termes, la sévérité des lésions serait donc d'après ce concept, le reflet direct de la déplétion d'un type cellulaire donné (Bentzen 2006). Cette hypothèse a fait suite à des travaux étudiant la réponse de tissus à renouvellement rapide tels que la moelle osseuse, l'épithélium intestinal, ou encore l'épiderme après irradiation. Ce concept a ensuite été appuyé par les travaux de C. Potten qui ont montré la place de la mort par apoptose des cellules souches épithéliales dans la cinétique d'évolution du syndrome gastro-intestinal (SGI) plaçant ce compartiment comme



une cible privilégiée des rayonnements ionisants (Potten 1977). Toujours en faveur de cette hypothèse, d'autres travaux ont par la suite montré que la protection du compartiment souche des cryptes favorise la diminution du SGI chez l'animal. L'administration par injection de R-spondine-1, un facteur de croissance des cellules souches intestinales (CSI) et un agoniste de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine, à des souris C57Bl/6J protège les animaux du SGI après une irradiation corps entier de 10,4, 12 et 14 Gy. Cet effet bénéfique passe par une diminution de l'apoptose radio-induite des CSI, une stimulation de la prolifération des cellules souches Lgr5<sup>+</sup> associée à une augmentation de la régénération cryptique et une amélioration de l'absorption intestinale (Bhanja et al. 2009).

Ces dernières années, d'autres travaux ont suggéré que le SGI serait une conséquence directe d'une vague de mort précoce par apoptose des cellules endothéliales microvasculaires intestinales. En d'autres termes, la mort des CSI serait une des conséquences de la dysfonction et de l'ischémie vasculaire. Cette hypothèse est soutenue par les travaux de F. Paris qui ont montré que la perte du compartiment endothélial intestinal intervenait de manière précoce (4h) et en amont de la mort des CSI dans un modèle d'irradiation corps entier chez la souris C57Bl/6 (doses allant de 12 à 15 Gy) (Paris et al. 2001). En accord avec ces précédentes observations, l'injection d'angiopoïétine-1 chez des souris FVB est associée avec une diminution du nombre de cellules endothéliales microvasculaires intestinales apoptotiques, et favorise la survie de ces animaux après une irradiation corps entier de 12 et 15 Gy (Cho et al. 2004). De plus, des travaux menés au laboratoire ont pu montrer que la réduction de la sévérité de l'entérite radique dans modèle d'irradiation localisée du grêle chez des souris déficientes pour le gène PAI-1, est associée avec une réduction du nombre de cellules endothéliales apoptotiques (Abderrahmani et al. 2012).

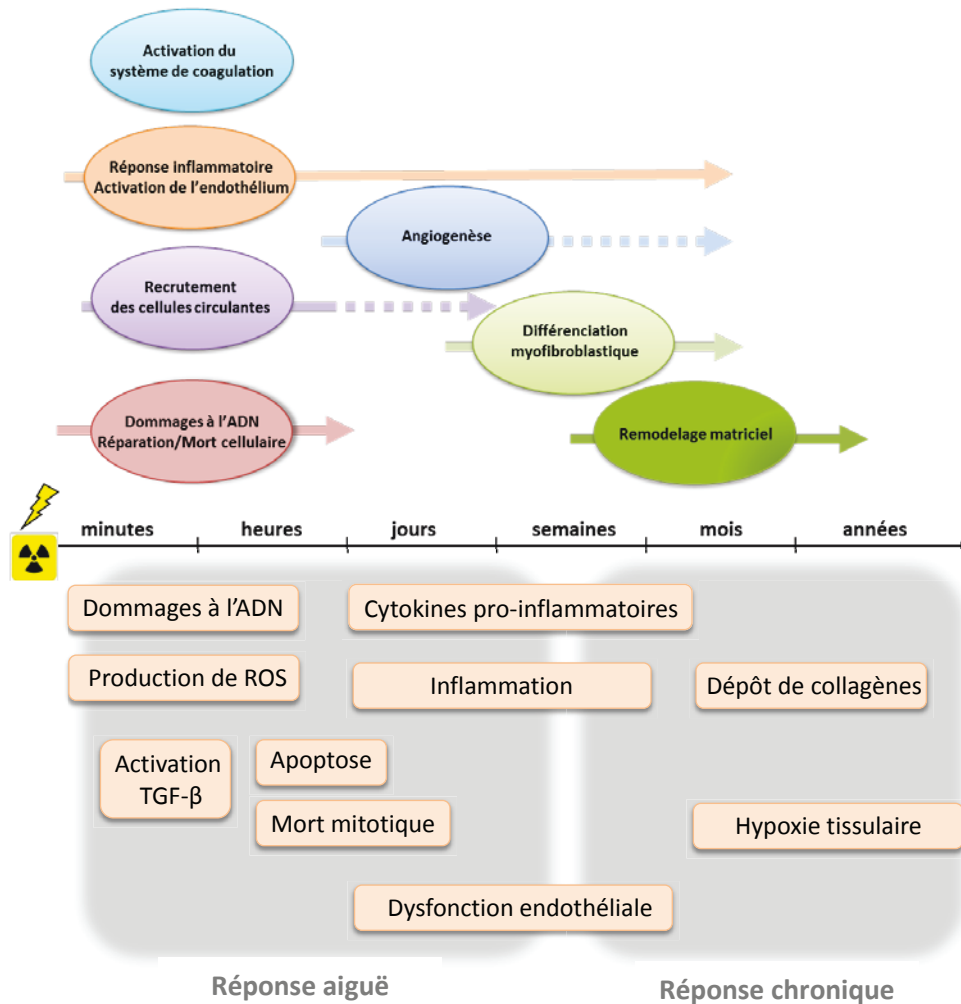
En résumé, le concept de la cellule cible a permis pendant de nombreuses années une avancée significative dans l'appréhension de la réponse des tissus sains aux rayonnements. Il est notamment à la base des protocoles actuels de radiothérapie fractionnée qui assurent une meilleure récupération des cellules saines. Cependant, après plusieurs années ce modèle a fait face à plusieurs limites et est aujourd'hui remis en cause. Ceci s'explique entre autre par le manque de corrélation entre la radiosensibilité cellulaire et individuelle évoqué précédemment. Cela suggère que la radiosensibilité d'un type cellulaire donné serait un facteur influent dans la réponse tissulaire mais agirait en étroite association avec la réponse aux rayonnements de tous les autres types cellulaires (mort ou activation cellulaire).

### **b. Les lésions radio-induites aux tissus sains : une réponse orchestrée**

C'est dans cette volonté d'améliorer la compréhension des mécanismes physiologiques et physiopathologiques de l'entérite radique que Denham et ses collègues ont effectué une réappréciation de la classification des dommages radio-induits en 2001 ([Denham et al. 2001](#)). Cette dernière a permis de classer les dommages aux tissus sains en trois catégories. La première regroupe l'ensemble des effets directs des rayonnements sur les cellules, on parle d'**effets cytotoxiques**. Cette réponse est initiée de manière précoce dès les premières minutes après l'irradiation. Elle fait intervenir la radiosensibilité cellulaire, leur capacité de réparation des dommages à l'ADN ou leur activité mitotique. Ces effets ont pour conséquences la mort clonogénique, la mort mitotique et la mort par apoptose des cellules irradiées. Le deuxième mécanisme correspond à une phase de progression qui regroupe les **effets indirects** provoqués par les rayonnements sur les cellules stromales et endothéliales. Ces dommages incluent notamment les effets bystander et aussi l'activation tissulaire en réponse à la mort cellulaire (synthèse de médiateurs pro-inflammatoires, de cytokines, de facteurs de croissance, de chimiokines ou de facteurs pro-coagulants). L'ensemble de ces acteurs conduit aux « mécanismes consécutifs » des lésions chroniques. Le dernier mécanisme concerne les **effets fonctionnels**. Ils résultent des changements d'expression génique des cellules irradiées et des modifications des molécules intra et extracellulaires ([Hauer-Jensen et al. 2014](#)).

Avec l'accumulation des connaissances ces dernières années, il est désormais admis que les événements tissulaires radio-induits n'ont pas lieu de façon isolée mais au contraire, sont orchestrés de manière dynamique et coordonnée dans le temps. La réponse des tissus sains aux rayonnements s'organise donc comme un « **continuum d'événements** » liés les uns aux autres, dans lequel les événements cellulaires et moléculaires participent en étroite collaboration à l'installation de la pathologie fibrotique ([Bentzen 2006](#)). Cette réponse est entre autres initiée par l'importante mort cellulaire précoce et l'activation du compartiment endothélial qui favorise le recrutement des cellules immunitaires circulantes (**Figure 7**). La réponse inflammatoire ainsi générée assure la mise en place d'un processus de cicatrisation tissulaire faisant intervenir différents acteurs impliqués dans l'angiogenèse et la fibrogenèse. La chronicité des lésions tissulaires, la modification du dialogue intercellulaire et des interactions cellules-matrice ainsi que l'activation continue des cellules du mésenchyme, sont autant de modifications qui génèrent un environnement propice à l'installation d'une fibrose

transmurale radio-induite. L'identification des principaux événements impliqués dans ce processus de cicatrisation pathologique permet une ouverture des champs d'investigations sur diverses approches thérapeutiques.

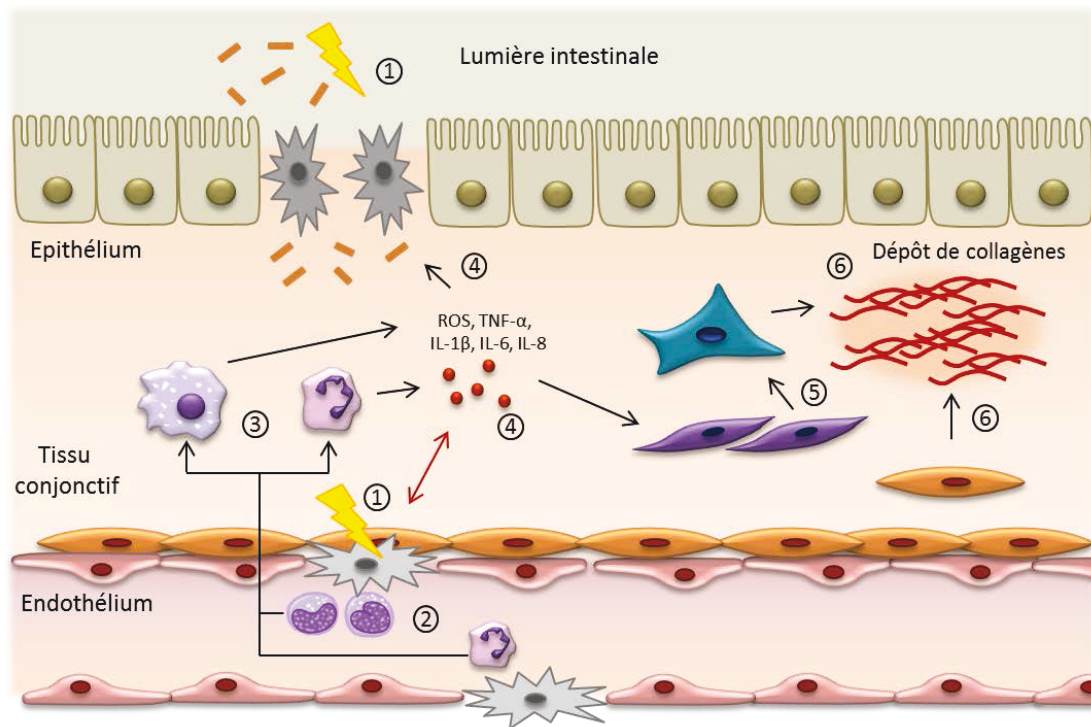


**Figure 7 :** Cinétique des événements cellulaires et moléculaires majeurs impliqués dans la réponse tissulaire radio-induite.

## 6. Caractéristiques de la réponse inflammatoire radio-induite

Le système immunitaire joue un rôle central dans la réponse des tissus sains aux rayonnements. Le processus inflammatoire est initié de manière précoce, dès les premières heures après irradiation, en réponse aux dommages cellulaires, à l'activation du compartiment vasculaire, à la translocation de bactéries commensales du tube digestif dans le tissu suite à une rupture de la barrière épithéliale et à une production importante de ROS. Cette réponse représente donc une cible thérapeutique de choix pour limiter l'évolution des dommages. La toxicité gastro-intestinale radio-induite conduit généralement à la mise en place d'un processus de cicatrisation chronique marqué par une réponse inflammatoire soutenue associée avec une réponse fibroproliférative persistante (Molla et al. 2007).

De par la nature de cette réponse, les rayonnements ionisants peuvent donc être considérés comme un signal pro-inflammatoire. La réponse inflammatoire est exacerbée d'une part, par l'acquisition d'un phénotype pro-thrombotique, pro-coagulant et anti-fibrinolytique de l'endothélium vasculaire irradié ; et d'autre par la sécrétion de médiateurs solubles pro-inflammatoires et pro-fibrosants de type chimiokines et cytokines par les cellules endothéliales (veinules post-capillaires) et stromales activées. Un certain nombre d'études s'accordent à montrer que l'irradiation induit de manière dose dépendante l'expression de divers médiateurs pro-inflammatoires tels que le TNF- $\alpha$ , le TGF- $\beta$ , l'IL-6 et l'IL-1 $\beta$ , aussi bien *in vivo* qu'*in vitro* (Rubin et al. 1995; Okunieff et al. 2005; Ong et al. 2010). La formation d'un gradient de molécules bioactives génère un microenvironnement favorable au recrutement rapide des leucocytes circulants au niveau du site lésé, caractéristique de l'inflammation aiguë (**Figure 8**). Le recrutement des cellules immunitaires est principalement orchestré par des modifications du profil d'expression génique des cellules endothéliales (CE) irradiées. L'irradiation induit notamment une surexpression de molécules d'adhésion de type CAM (Cell Adhesion Molecule), ainsi que de protéines appartenant à la famille des sélectines à la surface des cellules endothéliales (Molla et al. 2007). Ces modifications du profil d'expression des molécules d'adhésion seront par ailleurs présentées dans le chapitre 4 concernant l'activation de l'endothélium.



**Figure 8 :** Principales étapes de la réponse inflammatoire radio-induite : relation entre inflammation et fibrose digestive. ① Conséquence de l'irradiation sur la barrière épithéliale et l'endothélium vasculaire ; ② Recrutement des cellules immunitaires (GN, macrophages) ; ③ Extravasation des cellules immunitaires à travers l'endothélium et migration vers le site lésé ; ④ Synthèse de médiateurs pro-inflammatoires et libération de ROS ; ⑤ Activation des cellules mésenchymateuses ; ⑥ Synthèse de collagènes dans l'espace interstitiel par les myofibroblastes/CMLs activées.

Les granulocytes neutrophiles (GN) sont les premiers acteurs cellulaires recrutés par les macrophages résidents au niveau du site lésé via la sécrétion de chimiokines telles que CXCL8 (CXC-chemokine Ligand 8). Chez la souris C57BL/6, une augmentation de l'adhésion des GN à l'endothélium a été observée dès 24h dans un modèle d'irradiation abdominale (10 Gy) (Molla et al. 2003). Les GN jouent un rôle crucial dans la réponse antibactérienne grâce à leurs propriétés phagocytaires et microbicides, en libérant une importante quantité de ROS identifiée par le terme de « poussée respiratoire » (Schaue et al. 2010). L'utilisation de techniques de microscopie intravitale a permis d'améliorer les connaissances sur la cinétique du recrutement cellulaire mis en place après irradiation. Il est aujourd'hui établi que le recrutement des GN dans le tissu irradié s'effectue de manière précoce après irradiation, dès 2h après une irradiation abdominale de 20 Gy chez le rat, avec un pic observé à 6h post-exposition. Cette même étude a pu mettre en lumière que

l'augmentation du nombre de leucocytes circulants était corrélée avec l'augmentation du « rolling » et une diminution de la vitesse de roulement des leucocytes à la surface de l'endothélium. De plus, l'injection d'anticorps monoclonaux anti-CD18 et anti-ICAM-1 (InterCellular Adhesion Molecule-1) aux animaux permettait de reverser ces précédentes observations (Panes et al. 1995). Chez l'homme, une étude prospective a été menée chez dix-sept patients et a révélé que l'augmentation du nombre de GN dans le tissu irradié était observée jusqu'à 6 semaines après radiothérapie pour adénocarcinome rectal (Hovdenak et al. 2002). Cependant, il existe une ambiguïté sur le rôle précis des GN dans la pathogenèse de l'entérite et de la rectite radique. En effet, l'augmentation du flux de neutrophiles au sein de la zone irradiée pourrait exacerber la réponse inflammatoire (libération massive et continue de ROS) et accentuer les dommages tissulaires. A l'inverse, d'autres travaux dont certains effectués au laboratoire, ont pu montrer que des souris déficientes en mastocytes étaient protégées contre les lésions rectales mais présentaient un infiltrat de GN plus important que les souris sauvages, suggérant que les GN pourraient être bénéfiques dans certains cas (Blirando et al. 2011). De même, Flanders *et al* ont observé que l'augmentation du flux de GN 6 à 8h post irradiation confère une radioprotection aux animaux dans un modèle de fibrose cutanée chez les souris Smad3 déficientes (Flanders et al. 2008).

Par la suite, la synthèse de cytokines (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  et IL-1) par les GN activés permet via l'expression de MCP-1 (Monocyte Chemo Attractant Protein-1 ou CCL2) le recrutement et la transmigration des monocytes qui, une fois en dehors la circulation sanguine, se différencient en cellules dendritiques et en macrophages. Ces derniers ont un rôle essentiel à la fois dans la mise en place de la réponse inflammatoire, mais également dans la régénération tissulaire en assurant l'élimination des débris cellulaires par phagocytose des cellules apoptotiques reconnues comme des DAMPs (Damage-Associated Molecular Pattern) (Schaue et al. 2010). On distingue ainsi deux formes de macrophages dont la régulation de la balance est fonction du contexte cytokinique : les macrophages de type **M1 pro-inflammatoires** et les macrophages de type **M2, dits anti-inflammatoires et antioxydants** (Francois et al. 2013). Des études menées au laboratoire ont montré que l'irradiation est associée avec une augmentation de l'infiltration macrophagique dans des modèles de rectite et d'entérite radique chez la souris (Blirando et al. 2011; Rannou et al. 2015). En effet, ces récents travaux ont permis de mettre en évidence via un co-marquage CD68/iNOS, une augmentation du nombre de macrophages M1 dès 3 jours et jusqu'à 42 jours après irradiation localisée au niveau de

l'intestin grêle (modèle de l'anse extériorisée, 19 Gy) chez des souris floxées pour le gène PAI-1 (souris contrôles). En revanche, la délétion endothéliale-spécifique du gène PAI-1 (acteur potentiel dans l'entérite radique), est associée avec une baisse du nombre de M1 et une diminution des lésions radio-induites que ce soit en phase aiguë ou en phase tardive. A l'inverse, une augmentation significative du nombre macrophages de type M2 a été observée pour des temps tardifs après irradiation dans le modèle déficient pour PAI-1 en comparaison aux animaux contrôles. Ces données ont démontré que la variation d'expression d'un gène spécifique dans un compartiment donné peut d'une part affecter la balance M1/M2, et d'autre part que la présence de macrophages de type M1 semble exacerber les dommages dans ce modèle d'entérite radique (Rannou et al. 2015). D'autres études s'avèrent nécessaires afin d'approfondir les connaissances quant au rôle précis des macrophages dans l'initiation et la progression des dommages radio-induits à l'intestin.

La réponse des tissus sains aux rayonnements fait intervenir en étroite collaboration les réponses immunitaires innée et adaptative. La présence de nombreux lymphocytes T et B dans la lamina propria est couramment observée au sein de l'infiltrat et plus précisément au cours des phases subaiguë et chronique de l'inflammation radio-induite (Francois et al. 2013). La présence des lymphocytes en phase tardive s'explique par l'expression perpétuelle de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 $\alpha$  et  $\beta$  par exemple exprimées jusqu'à 8 et 26 semaines après une irradiation thoracique de 12,5 Gy chez la souris (Rubin et al. 1995). Les lymphocytes jouent un rôle clef dans le développement de la fibrose notamment via la sécrétion d'IL-13, de TGF- $\beta$  et de PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), impliqués dans le recrutement et l'activation des fibroblastes résidents et des macrophages (Wynn 2008). De plus, les lymphocytes T sont des acteurs essentiels dans la mise en place de la réponse cytotoxique via les LT CD8<sup>+</sup> et adaptative via les LT CD4<sup>+</sup>. Ces derniers assurent le lien avec la réponse humorale via leur rôle de CPAg (Cellule Présentatrice de l'Antigène). Après activation, les LT CD4<sup>+</sup> Th0 sont capables de se différencier sous l'influence de certaines cytokines (IL-6, IL-12, TGF- $\beta$ ) en quatre sous-populations distinctes dont le profil d'expression cytokinique est propre à chaque sous-population et leur confère des fonctions différentes. On distingue ainsi les Th1, les Th2, les Th17 qui possèdent un profil pro-inflammatoire et les Treg qui agissent en tant qu'immuno-modulateurs de la réponse inflammatoire. Des interrogations subsistent encore quant à l'influence exacte d'une exposition aux rayonnements sur la polarisation des LT (Francois et al. 2013). Toutefois, il a



été montré que l'irradiation induit un déséquilibre de cette balance au profit d'une polarisation Th2 en phase aiguë (6h et 7 jours) et ce jusqu'à 26 semaines post exposition, dans des modèles d'irradiation abdominale et de rectite radique chez le rat en dose unique et fractionnée (Gremy et al. 2006; Gremy et al. 2008). Ces résultats ont été confirmés dans un modèle de souris déficientes en LT Th1 (souris T bet<sup>-/-</sup>). Dans ce modèle, la réduction du nombre cellules Th1 est associée avec une exacerbation de la réponse Th2, une augmentation de l'expression du TGF-β1 ainsi qu'une réduction de l'expression de l'INF-γ (marqueur des Th1), à 15, 30 et jusqu'à 90 jours après une irradiation abdominale de 10 Gy. Au niveau histologique, ce profil Th2 est associé avec une augmentation du dépôt collagénique et de façon générale, une augmentation la radiosensibilité des animaux (Linard et al. 2012). Néanmoins, d'autres études s'avèrent nécessaires afin de déterminer de façon plus précise le rôle de ces différents acteurs cellulaires et préciser les liens entre la réponse immunitaire adaptative et l'évolution des dommages radio-induits.

On estime aujourd'hui que la moitié des traitements anti-cancéreux concerne des tumeurs de la sphère abdomino-pelvienne et nécessite l'utilisation d'une radiothérapie. Le tube digestif est identifié comme un OAR dans le traitement de certaines tumeurs. En clinique, l'atteinte des tissus sains au niveau de la sphère digestive est caractérisée par des symptômes aigus et tardifs invalidants pour les patients regroupés sous le terme de « pelvic radiation disease ». Cette radiosensibilité accrue s'explique par l'organisation structurale et la composition cellulaire particulières de l'intestin. Des désaccords persistent à ce jour concernant la cinétique des événements cellulaires précoces impliqués dans la réponse des tissus sains aux rayonnements. Toutefois, cette réponse apparait être multifactorielle, dans laquelle un ensemble d'évènements imbriqués les uns aux autres participent ensemble et de manière coordonnée dans l'initiation et l'évolution de la pathogenèse radio-induite. De plus, la composante inflammatoire constitue un environnement déterminant dans l'initiation de la réponse des tissus sains dont la durée d'activation influence directement le développement d'effets secondaires chroniques. Dans ce contexte, ce travail de thèse s'est concentré sur les dommages radio-induits au niveau du rectum et sur l'étude des changements phénotypiques des cellules endothéliales au cours du développement de la fibrose radique au niveau de cet organe.



## **Chapitre 3. La fibrose intestinale radio-induite**

Lors d'une agression physique ou chimique, l'organisme met en place une réponse globale et limitée dans le temps permettant d'une part de limiter les dommages tissulaires, et d'autre part d'enclencher des mécanismes particuliers assurant la cicatrisation des tissus. La fibrose tissulaire fait partie intégrante du processus de cicatrisation physiologique, mais sa chronicité explique son aspect pathologique. La fibrose est initiée par une activation accrue et auto-entretenu dans le temps de la réponse inflammatoire qui favorise la formation d'une zone cicatricielle riche en collagène, à l'origine de la déstructuration de l'architecture tissulaire. Ainsi, les propriétés mécaniques et fonctionnelles du tissu sont compromises au sein des zones fibreuses. Bien que l'étiologie des différentes fibroses soit variable, la plupart des affections fibrotiques présentent de nombreuses analogies quant aux mécanismes cellulaires et moléculaires mis en jeu. D'autre part, il apparaît que les mécanismes gouvernant l'inflammation diffèrent de ceux impliqués dans le maintien et la chronicité de la fibrose. Comme évoqué dans le précédent chapitre, la fibrose digestive est un devenir commun à de nombreux patients ayant reçu une radiothérapie abdomino-pelvienne. Les solutions thérapeutiques actuelles sont limitées sans possibilité de réversion de la fibrose. C'est dans ce contexte que s'inscrit ce travail de thèse qui tend à identifier de nouveaux mécanismes cellulaires et moléculaires participant ainsi au développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.

### **1. De la cicatrisation à la fibrose : un équilibre fragile**

On distingue schématiquement trois étapes tissulaires majeures participant au développement de la fibrose radio-induite : une phase d'initiation faisant suite aux dommages, une tentative de réparation tissulaire et l'activation chronique des mécanismes de cicatrisation. En réponse à l'irradiation, la phase d'initiation fait intervenir des acteurs cellulaires et moléculaires similaires à ceux impliqués dans le processus de cicatrisation physiologique. Les principales différences entre ces deux processus de cicatrisation concernent d'une part la répétabilité de l'agression (protocole fractionné), et d'autre part l'absence de résorption des mécanismes cicatriciels. Ainsi, le tissu sain irradié en début de traitement ne présentera pas le même aspect ni la même composition cellulaire qu'à la fin de

ce dernier. Le processus de cicatrisation radio-induit apparaît comme un phénomène pathologique chronique et auto-entretenu dans le temps, dans lequel les myofibroblastes jouent un rôle prépondérant. Il est à noter que la séquence d'évènements cellulaires et tissulaires aboutissant à la mise en place du processus fibrotique radio-induit est comparable à celle décrite dans d'autres pathologies telles que les maladies inflammatoires chroniques du tube digestif, à savoir la maladie de Crohn et la rectocolite hémorragique.

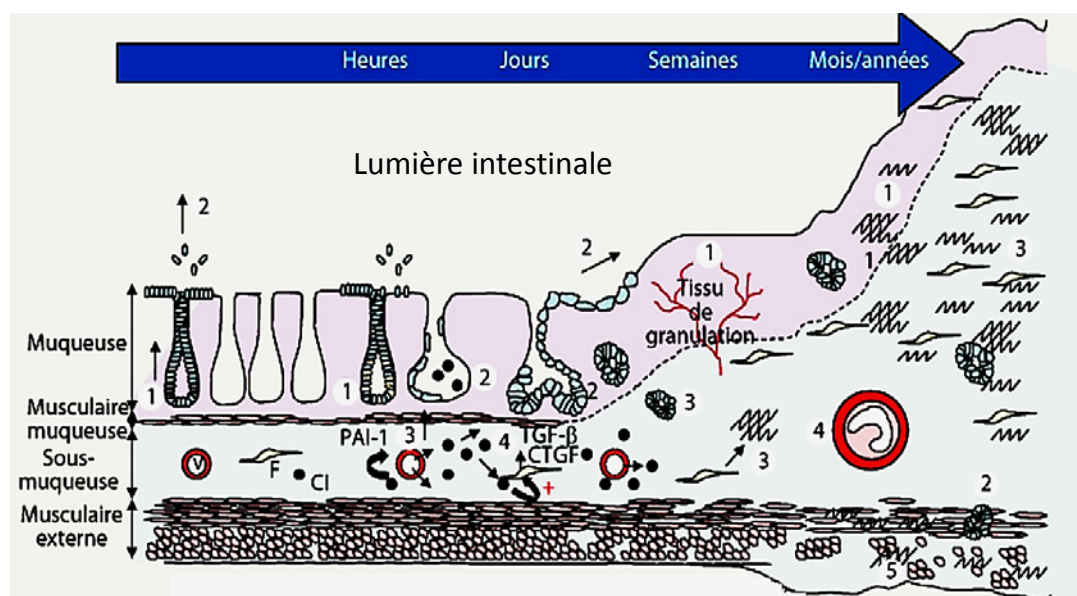
#### **a. La phase pré-fibreuse**

Cette phase est initiée par la mort radio-induite précoce au niveau des compartiments souches et progéniteurs des cryptes qui compromet le renouvellement de l'épithélium fonctionnel. Cette érosion de la barrière épithéliale favorise la translocation d'agents délétères (bactéries et toxines) de la lumière intestinale vers le tissu (**Figure 9**). Le compartiment endothélial joue également un rôle central dans la réponse tissulaire précoce aux rayonnements notamment en favorisant l'activation du système de coagulation et en orchestrant la mise en place de la réponse inflammatoire. L'irradiation peut induire l'apoptose de certaines cellules endothéliales et influencer indirectement l'état d'activation de l'endothélium vasculaire. La production importante de médiateurs cytotoxiques de type ROS/RNS (Reactive Nitrogen Species), et de facteurs pro-inflammatoires par les cellules endothéliales favorise l'inactivation de certaines protéines aux propriétés anticoagulantes telles que la thrombomoduline (TM). Ceci favorise l'acquisition d'un phénotype pro-coagulant, anti-fibrinolytique et une perte de la thromborésistance de l'endothélium ([Francois et al. 2013](#)). De plus, l'activation endothéliale engendre une augmentation de la perméabilité vasculaire qui encourage la fuite de protéines plasmatiques (fibrine) et la formation d'un œdème sous muqueux ([Francois et al. 2009](#)). L'ensemble des médiateurs libérés contribue à la modulation de la composition cytokinique du microenvironnement tissulaire participant également à l'activation des cellules mésenchymateuses telles que les fibroblastes et les CML.

#### **b. La fibrose jeune**

La fibrose jeune correspond à la première étape du processus de réparation tissulaire. Elle est caractérisée par la formation du tissu de granulation qui correspond à une tentative de comblement de la zone lésée. Le tissu de granulation est richement vascularisé et

majoritairement composé de MEC synthétisée par les fibroblastes activés (**Figure 9**). Les cryptes non-stérilisés s'activent et stimulent la prolifération épithéliale afin de rétablir un recouvrement muqueux, on parle de cryptes hyperplasiques. Avec la persistance du processus inflammatoire, l'œdème sous-muqueux se développe et les fibroblastes activés synthétisent de grandes quantités de MEC ([Martin et al. 2000](#); [Francois et al. 2009](#)).



**Figure 9** : Etapes du développement de la fibrose digestive radio-induite (d'après François *et al.* 2009).

### c. Le développement de la fibrose établie

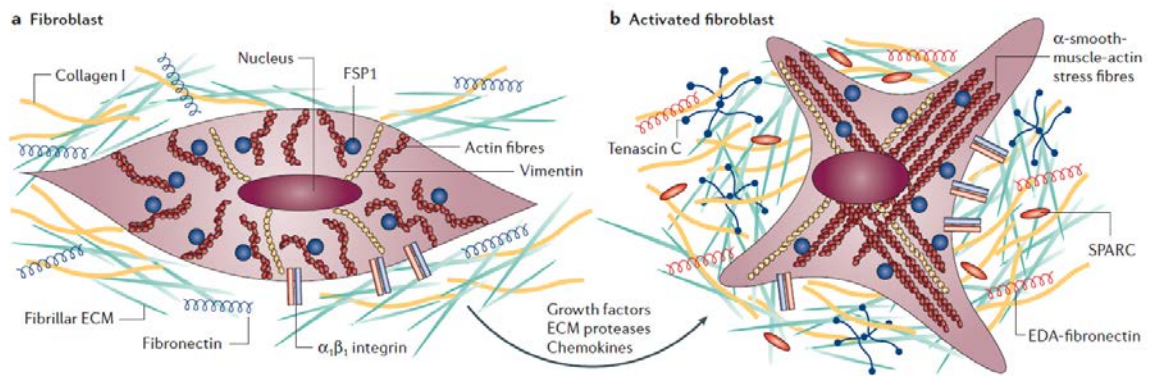
La chronicité de l'inflammation et l'activation du tissu conjonctif et plus précisément du compartiment mésenchymateux, engendrent un emballement du processus de cicatrisation. Dans un contexte de cicatrisation physiologique, la régulation de l'expression des métalloprotéinases (MMPs), enzymes protéolytiques qui participent à la dégradation de la MEC, est assurée par des inhibiteurs spécifiques appelés les TIMPs (Tissue Inhibitor of MetalloProteinase). Il existe donc un équilibre dynamique de la balance synthèse/catabolisme de la MEC ([Pardo et al. 2006](#)). Or, dans le contexte de l'irradiation, la dérégulation de ces mécanismes entraîne une accumulation excessive de collagènes fibrillaires de type I et III et de fibronectine dans l'espace interstitiel ([Rubin et al. 1995](#); [Denham et al. 2002](#); [Strup-Perrot et al. 2004](#)). Au niveau tissulaire, la fibrose établie est caractérisée par la présence d'un tissu de cicatrisation dense, hypoxique et paucicellulaire. Le collagène en excès envahit l'ensemble

des compartiments, entraîne un épaississement pariétal responsable de la perte de souplesse du tissu, conduisant à la réduction de la lumière intestinale (Francois et al. 2009).

## 2. Myofibroblaste et fibrose : un acteur cellulaire déterminant

Le rôle crucial des myofibroblastes dans le remodelage et la cicatrisation tissulaire est aujourd'hui bien connu. En conditions physiologiques, ils participent au maintien de l'homéostasie tissulaire en exerçant des forces de contraction de la MEC. Au niveau de l'intestin, les myofibroblastes péri-cryptiques assurent le maintien du statut immature de la niche à la base des cryptes et contrôlent la prolifération des CS. Lorsque le processus de cicatrisation est enclenché, l'activation des fibroblastes résidents du tissu constitue la principale source de myofibroblastes responsables de la synthèse de MEC. En conditions basales, les fibroblastes sont localisés au niveau du tissu conjonctif et assurent la synthèse continue et contrôlée de MEC composée de collagènes interstitiels, de protéoglycanes et de protéines non-collagéniques. La MEC possède un rôle essentiel de maintien de la structure tissulaire mais elle assure également le stockage de divers facteurs de croissance et de protéines sous forme de clusters permettant une activation cellulaire rapide (Principi et al. 2013).

L'activation des fibroblastes est orchestrée dans un intervalle de temps limité et restreinte au processus de cicatrisation tissulaire. En conditions basales, les cellules fibroblastiques présentent peu de fibres d'actine associées aux interactions cellule-cellule, aux contacts cellule-MEC et synthétisent peu de matrice. Après irradiation, la déstructuration de la MEC et la présence de divers stimuli engendrent des modifications mécaniques du microenvironnement (forces de cisaillements différentes), permettant l'activation des fibroblastes. En réponse, ces derniers acquièrent un phénotype contractile via l'expression de fibres de stress cytoplasmiques composées de  $\beta$ -actine et de myosine, caractéristiques du stade intermédiaire **proto-myofibroblaste** (Hinz et al. 2007; Van De Water et al. 2013). Les fibres de stress assurent ainsi une connexion stable entre le cytoplasme via les jonctions adhérentes N-cadhérine, et les protéines de la MEC au niveau des sites riches en intégrines. *In vivo*, ces associations cellules-MEC sont identifiées par le terme « fibronexus » et « supermature focal adhesion » (FAs) *in vitro* (Singer et al. 1984).

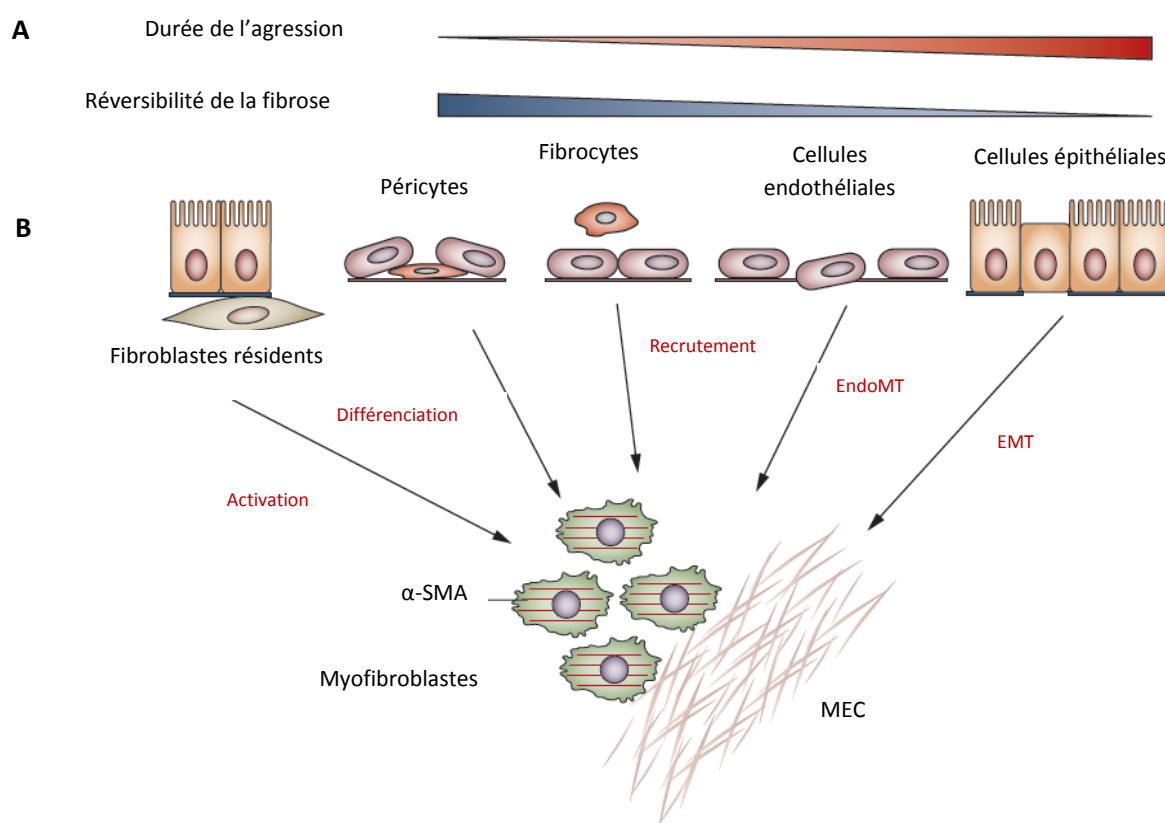


**Figure 10 : Relation entre la matrice extracellulaire et l'activation myofibroblastique (d'après Kalluri et al. 2006)**

La forme activée ou **myofibroblaste différencié**, est caractérisée par la formation de fibres de stress composées d'alpha-smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) (Tomasek et al. 2002) (Figure 10). L'expression de cette protéine est à l'origine de l'importante capacité contractile des myofibroblastes. L'expression de l' $\alpha$ -SMA est régie par au moins trois événements extracellulaires cruciaux : i) la surexpression de TGF- $\beta$ 1 dans le microenvironnement, ii) la présence de protéines de la MEC spécifiques de type intégrines/fibronectine et iii) un facteur de stress suffisamment élevé pour induire des perturbations de l'organisation de la MEC (Tomasek et al. 2002; Hinz et al. 2007). En comparaison avec les fibroblastes, les myofibroblastes présentent une augmentation de l'expression des collagènes de type I et III, de protéoglycanes, de fibronectine ainsi qu'une pléthore d'autres protéines et facteurs de croissance impliqués dans la régulation du cycle et du devenir cellulaire. Une fois la régénération tissulaire complète, la diminution d'expression du TGF- $\beta$ 1 entraîne une réduction de l'activité des myofibroblastes qui seront éliminés par un processus d'apoptose massif.

Il est aujourd'hui admis que les myofibroblastes possèdent des origines cellulaires différentes (Figure 11 B) (Rieder et al. 2008; Wynn 2008). En effet, les myofibroblastes peuvent provenir de l'activation et la différenciation des fibroblastes résidents du tissu, de la différenciation de divers types cellulaires tels que les cellules étoilées hépatiques activées, de la dédifférenciation des CMLs périvasculaires, du recrutement des fibrocytes provenant de la

moelle (forme circulante immature des fibroblastes). De même, l'épithélium constitue également un réservoir propice au pool myofibroblastique via la transition épithélium-mésenchyme ou EMT (Hinz et al. 2007; Liu 2011). De façon intéressante, il a été montré que l'origine cellulaire des myofibroblastes est fonction de la nature du tissu. Par exemple, dans un contexte de fibrose pulmonaire les myofibroblastes sont essentiellement issus de l'activation des fibroblastes résidents du tissu alors qu'au niveau hépatique ces derniers proviennent de la différenciation des cellules étoilées. De même, la formation de plaques d'athérome est associée à la présence de myofibroblastes provenant de la dédifférenciation des CMLs (Hinz et al. 2007). Plus récemment, les travaux de Zeisberg *et al* ont permis d'identifier l'endothélium comme une nouvelle source contribuant au pool de myofibroblastes dans des contextes de fibrose cardiaque et de rétinopathie diabétique, via le processus de transition endothélium-mésenchyme ou EndoMT (Zeisberg et al. 2007b; Abu El-Asrar et al. 2015). Ce dernier processus fait l'objet de ce travail de thèse et sera présenté dans le chapitre 5 de ce manuscrit.



**Figure 11** : Les myofibroblastes dans la fibrose : (A) Relation entre la durée des dommages et la réversibilité de la fibrose. (B) Différentes sources cellulaires de myofibroblastes impliqués dans la fibrose (d'après Liu 2011).



### 3. Principaux acteurs moléculaires de la fibrose

Parmi les principales cytokines fibrogéniques impliquées de façon précoce dans les maladies fibroprolifératives, la présence de TGF- $\beta$ 1 dans le microenvironnement stimule la synthèse de collagènes par les fibroblastes et des CMLs activées (Principi et al. 2013). *In vivo*, la surexpression du TGF- $\beta$ 1 a été observée dans de nombreux modèles expérimentaux de fibrose radio-induite aussi bien au niveau de la peau, de l'intestin, de la vessie ou encore des reins. L'utilisation d'un modèle d'entérite radique chez le rat a pu montrer que l'irradiation (dose unique de 21 Gy) induit une augmentation de l'expression du TGF- $\beta$ 1 par les cellules inflammatoires et les cellules fibroblastiques 24 heures jusqu'à 26 semaines après l'exposition (Hauer-Jensen et al. 1998; Wang et al. 1998b). L'étude de l'expression des trois isoformes du TGF- $\beta$ , à savoir le TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2 et le TGF- $\beta$ 3 a permis de confirmer l'expression accrue du TGF- $\beta$ 1 par les cellules épithéliales, endothéliales microvasculaires, les fibroblastes et les CMLs avec un pic 2 semaines post-irradiation (Wang et al. 1998b). Ces résultats ont été corroborés dans un modèle d'irradiation abdominale chez la souris où une augmentation de l'expression du TGF- $\beta$ 1 a été observée pour des doses de 12,5 et 13,5 Gy. Cette augmentation s'avère dose-dépendante et est associée à l'augmentation d'autres cytokines telles que le TNF- $\alpha$  et l'IL-6 au niveau des sites lésés (18 à 25 semaines après irradiation) (Okunieff et al. 2005). Ces précédentes observations ont pu être transposées en clinique via l'étude de l'expression du TGF- $\beta$  chez des patients atteints d'entérite radique. Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence l'existence d'une augmentation de l'immunoréactivité de cette protéine par les myofibroblastes et au niveau de la matrice, des vaisseaux de la lamina propria et de la sous-muqueuse dans les tissus irradiés (Vozenin-Brotons et al. 2003). Enfin, la surexpression de TGF- $\beta$ 1 a de même été observée dans d'autres pathologies inflammatoires du tube digestif notamment chez des patients atteints de maladie de Crohn (di Mola et al. 1999). Ces résultats soulignent donc l'implication majeure du TGF- $\beta$ 1 au cours des processus inflammatoire et fibreux suggérant l'existence de similitudes au regard des mécanismes cellulaires et moléculaires chez les patients atteints de maladie de Crohn et d'entérite radique.

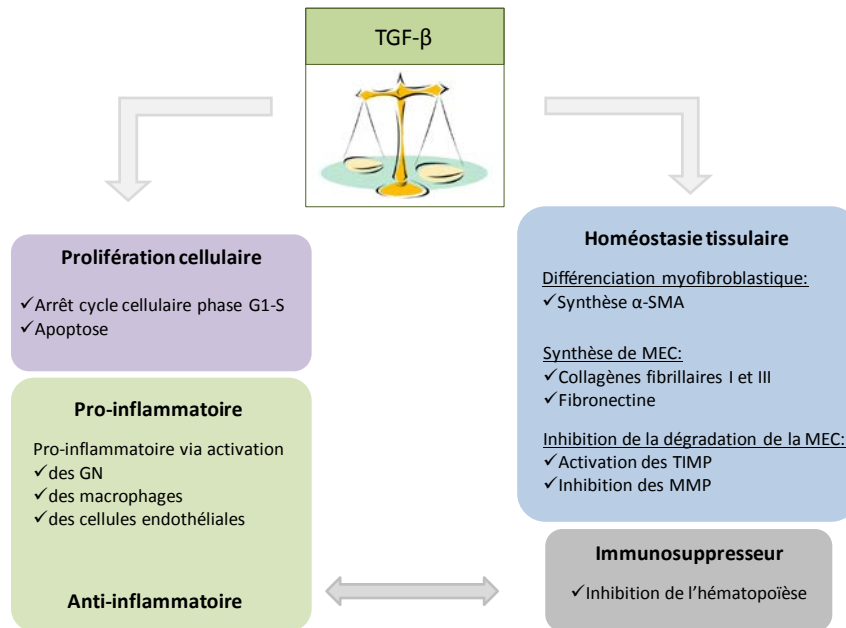
D'autres cytokines, chimiokines et facteurs de croissance sont également incriminés dans des pathologies d'ordre fibrotique. Par exemple, l'extravasation de protéines plasmatiques génère la formation d'une matrice provisoire riche en facteurs de croissance dont le PDGF, un chimioattractant des cellules mésenchymateuses, qui favorise le

recrutement des fibroblastes au niveau du tissu de granulation ([Van De Water et al. 2013](#)). Le CTGF (Connective Tissue Growth Factor), le TGIF1 (TGF- $\beta$ /Smad repressor TG-Interacting Factor 1), le TGF- $\beta$ 2, le TNF- $\alpha$ , l'IL-6, l'IGF-1 (Insulin Growth Factor-1) ou encore l'IL-1 $\beta$  sont d'autres médiateurs clefs dans l'installation de la pathologie fibrotique ([Vozenin-Brotons et al. 2004](#)). Les travaux de Richter *et al* ont également montré une corrélation entre l'augmentation de l'expression du TGF- $\beta$  et celle du CTMC (Connective Tissue Mast Cell) à 2 et 26 semaines après irradiation, dans un modèle d'entérite radique chez le rat ([Richter et al. 1997b](#)). Il est à noter que la chronicité de l'agression assure la stabilité de la synthèse de ces acteurs facteurs pro-fibrotiques dans le temps, présence chronique qui est directement corrélée avec l'irréversibilité de la fibrose (**Figure 11 A**).

#### **a. Le TGF- $\beta$ 1 dans l'initiation de la fibrose**

Le TGF- $\beta$ 1 est une cytokine multifonctionnelle impliquée dans la régulation de plusieurs voies de signalisation et possède de ce fait une pléthore de fonctions biologiques. Tout d'abord, il est identifié comme un inhibiteur majeur de la prolifération cellulaire en bloquant la transition de la phase G1 à S, et il peut également induire l'apoptose dans plusieurs types cellulaires. Une de ses principales fonctions concerne son rôle d'immunosuppresseur puissant. En effet, le TGF- $\beta$ 1 peut inhiber l'hématopoïèse et la prolifération des lymphocytes T par exemple. Cependant, de par ses fonctions pléiotropiques, il possède une action plus ambiguë dans un contexte inflammatoire, en ayant à la fois une action pro et anti-inflammatoire, en fonction du microenvironnement. L'augmentation de l'immunoréactivité du TGF- $\beta$ 1 a surtout été observée pour des temps précoces après irradiation (de 24h à 2 semaines dans un modèle d'entérite radique chez le rat) ([Hauer-Jensen et al. 1998](#); [Haydont et al. 2008](#)). Ainsi, il est admis que le TGF- $\beta$ 1 possèderait dans un premier temps une action pro-inflammatoire et assurerait le recrutement des cellules immunitaires par chimiotactisme ([Principi et al. 2013](#)). Dans les étapes ultérieures, il exercerait une action anti-inflammatoire sur les cellules activées. Enfin le TGF- $\beta$ 1 joue un rôle majeur dans l'homéostasie tissulaire en régulant la synthèse de MEC via l'activation des fibroblastes (**Figure 12**) ([Martin et al. 2000](#); [Vaughan et al. 2000](#)).



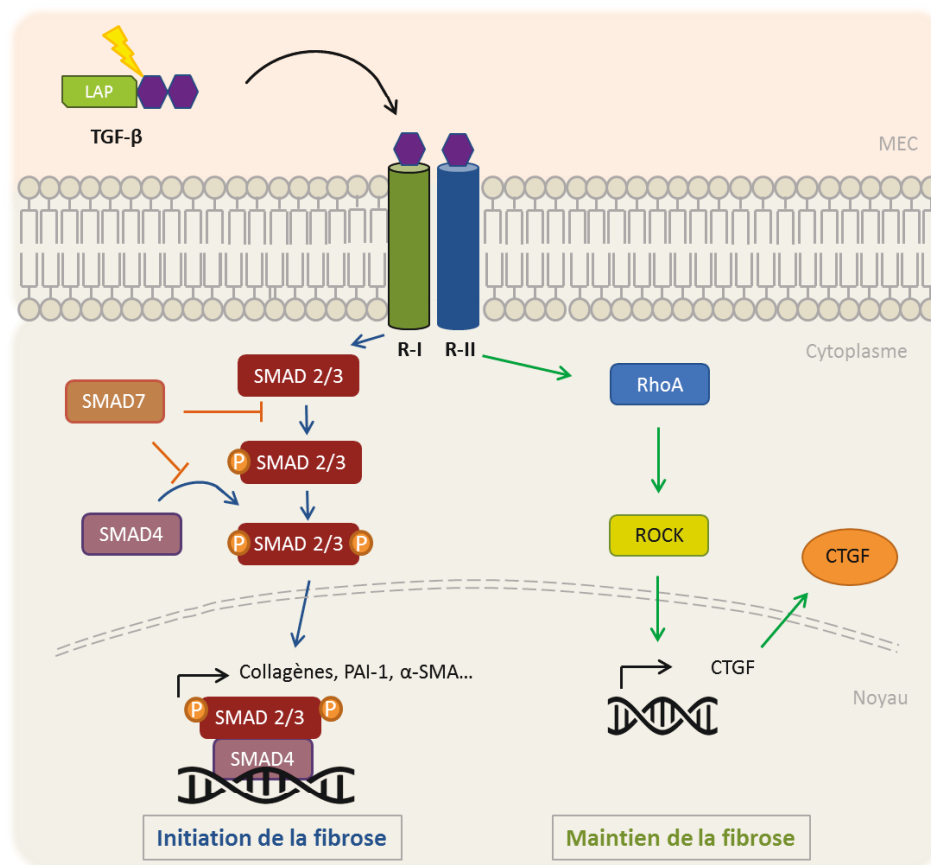


**Figure 12 : Les principales fonctions du TGF-β.**

Le TGF-β1 est un homodimère de 25 kDa sécrété de manière ubiquitaire sous la forme d'un complexe de haut poids moléculaire, biologiquement inactif appelé LLC (Large Latent Complex). Ce complexe est formé du TGF-β1 associé à un peptide LAP (Latency-Associated Peptide) et d'une protéine LTBP-1 (Latent TGF-β1-Binding Protein) (Specia et al. 2012). Cette dernière protéine est capable de se lier aux protéines matricielles telles que la fibronectine et la vitronectine, et constitue ainsi une réserve de LLC disponible et ancrée à la surface de la MEC. Le TGF-β1 peut être dissocié du complexe LLC de plusieurs manières. L'action d'enzymes impliquées dans le processus de cicatrisation (MMP-9 par exemple) assure son activation par protéolyse de la séquence peptidique entre le LAP et le LTBP-1. L'action des sérines protéases telle que la plasmine permet de même son activation. De plus, l'interaction entre le LLC et la thrombospondine-1 (TSP-1) favorise également la dissociation du LLC et l'activation du TGF-β1 (Akhurst et al. 2012)

La voie de transduction du signal TGF-β est aujourd'hui bien décrite (**voie canonique**). La fixation d'un ligand sur son récepteur induit la formation d'un complexe hétéromérique par phosphorylation du récepteur TβR-I par le récepteur TβR-II (**Figure 13**). Il existe sept types de récepteurs I appelés ALK (Activin receptor-Like Kinases 1 à 7), et cinq récepteurs de type II : Activin Receptors (ActR) type IIA et IIB, BMP type II receptor, AMH

type II et le T $\beta$ R-II. Ces récepteurs possèdent une activité sérine-thréonine kinase qui permet dans un premier temps la phosphorylation du T $\beta$ R-II, puis l'activation du domaine kinase du récepteur TR $\beta$ -I (Martin et al. 2000). Bien que le TGF- $\beta$ 1 soit impliqué dans la régulation de diverses voies de signalisation (Mitogen-Activated Protein Kinase MAPK, c-Jun N terminal kinase, p38 kinases et les voies JAK-STAT), la voie des protéines SMAD (Small Mother Against Decapentaplegic), semble majoritairement impliquée dans les mécanismes associés à la fibrose radio-induite. A ce jour, huit protéines Smads ont été identifiées dont les Smads-2, 3, 4 et 7, qui sont particulièrement impliquées dans la transduction du signal dépendante du TGF- $\beta$ 1. Parmi les principaux gènes cibles de la voie SMAD-TGF- $\beta$ 1 ; on distingue l' $\alpha$ -SMA, les collagènes fibrillaires de types I et III (COL1 $\alpha$ 1, COL3 $\alpha$ 1), la fibronectine, le CTGF ainsi que PAI-1 (Akhurst et al. 2012). Le TGF- $\beta$ 1 inhibe également l'expression de collagénases et stimule l'expression des inhibiteurs des métalloprotéinases (TIMP-1).



**Figure 13** : Vue d'ensemble de la voie canonique SMAD-dépendante du TGF- $\beta$ 1 (à gauche), et de la voie Rho/ROCK (à droite), impliquées dans l'initiation et le maintien de la fibrose.

Il existe en parallèle une autre voie de signalisation induite par le TGF- $\beta$ , indépendante de l'activation des Smads, impliquée dans la différenciation fibroblastique. On parle de la voie **TGF- $\beta$  non-canonique (Figure 13)**. Cette voie fait intervenir les protéines de la famille des RhoGTPases (RhoA, B, C, Rac-1 et cdc 42). Les petites GTPases ont une pléthore de fonctions biologiques et sont impliquées dans le contrôle de l'adhésion cellulaire, la formation des fibres de stress via la conversion de la G-actine globulaire en filaments de F-actine, et dans l'initiation de l'assemblage de la machinerie contractile d'actomyosine (Riches et al. 2015). La modulation de ces fonctions dépend essentiellement de l'état d'activation des effecteurs présents en aval de la cascade appelés les protéines kinases ROCK-1 et -2 (Rho-associated Coiled-coil-containing protein Kinase). Concernant les gènes cibles de cette voie, il a notamment été décrit que la translocation nucléaire du facteur MRTFs (Myocardin-Related Transcription Factor) activé par les ROCKs induit l'expression de l' $\alpha$ -SMA, de PAI-1 et de gènes anti-apoptotiques tels que Bcl-2 (B cell lymphoma-2) et XIAP (X-linked Inhibitor of Apoptosis). Il a de plus été montré que l'expression du CTGF était principalement dépendante de cette voie. Chez l'homme, l'augmentation de l'immunoréactivité tissulaire du TGF- $\beta$ 1 est associée à l'activation par phosphorylation de la Smad-2/3, principalement observée au niveau de l'endothélium vasculaire. Ces résultats ont été corrélés *in vitro* par l'observation d'une translocation des Smad-3 et 4 au noyau chez des CMLVs exposées à des cellules endothéliales irradiées (Milliat et al. 2006). Bien que la présence de TGF- $\beta$ 1 fasse partie des signaux clefs dans l'activation des myofibroblastes, elle n'est pas suffisante pour induire la différenciation myofibroblastique et nécessite donc la présence d'autres facteurs environnementaux (Van De Water et al. 2013).

#### **b. Rôle du CTGF dans le maintien de la fibrose**

Le CTGF ou CCN2, est identifié comme une cible transcriptionnelle majeure du TGF- $\beta$ 1. Il s'agit d'un peptide de 38 kDa riche en cystéine synthétisé par les fibroblastes et les cellules endothéliales activés. Le CTGF est connu pour être un agent autocrine favorisant l'expression des gènes codant pour l'intégrine  $\alpha$ 5, le collagène de type I et la fibronectine. Son rôle potentiel dans le maintien de la fibrose radio-induite a été évoqué suite à la mise en évidence d'une surexpression du CTGF dans les tissus radiques digestifs. Des études immunohistochimiques ont pu révéler que cette surexpression de CTGF était corrélée à la fois avec l'expression du TGF- $\beta$ 1 et avec le dépôt collagénique dans des tissus lésés au niveau du

tissu conjonctif et de l'endothélium vasculaire (Vozenin-Brotons et al. 2003). D'un point de vue moléculaire, deux voies de signalisation ont été identifiées dans la régulation de l'expression du CTGF. Il a notamment été montré que la surexpression du CTGF induite par le TGF- $\beta$ 1 passe principalement par la voie des SMAD dans les CMLs saines alors qu'elle est initiée par la voie Rho/ROCK dans les CMLs provenant de patients atteints d'entérite radique (Haydont et al. 2005). Ces mêmes auteurs ont également mis en évidence que le TGF- $\beta$ 1 est impliqué dans la phase d'initiation de la fibrose via l'activation de la voie SMAD et que le maintien de ce phénotype profibrotique est assuré par l'expression du CTGF via l'activation de la voie Rho/ROCK dans la phase chronique (Haydont et al. 2008). L'activation différée de ces deux voies de signalisation soulève de nouvelles hypothèses quant au basculement du processus de cicatrisation vers un processus fibrotique.

### c. Le TGIF1

Ces dernières années, le TGIF1 (TG-Interacting Factor 1) a été identifié comme étant un acteur stratégique dans la régulation de la voie du TGF- $\beta$ 1. Cette voie de signalisation est en effet hautement régulée par l'action des Smads inhibitrices (I-Smads : Smad-6 et -7) mais également via l'expression de co-répresseurs tels que le TGIF1, c-Ski et SnoN. Le TGIF1 agit comme un inhibiteur compétitif en se fixant sur Smad-2 et inhibe la transcription des gènes cibles de la voie canonique du TGF- $\beta$ . L'importance de la régulation de la voie TGF- $\beta$ 1 a notamment été soulignée dans un modèle de néphropathie obstructive chez la souris où les auteurs ont pu mettre en évidence que l'augmentation de la dégradation de la protéine Smad7 endogène était associée avec le développement d'une fibrose rénale dans ce modèle (Fukasawa et al. 2004). Le rôle potentiel du TGIF1 dans la fibrose a été souligné après avoir observé une augmentation de son immunoréactivité sur des tissus colorectaux de patients souffrant de rectite radique (Hneino et al. 2012a; Hneino et al. 2012b). L'utilisation d'un modèle transgénique déficient pour le TGIF1 (souris TGIF1<sup>-/-</sup>) a permis de montrer que la perte d'expression de ce facteur est associée avec une sensibilisation des animaux à l'irradiation (Hneino et al. 2012b). *In vitro*, l'inhibition de l'expression du TGIF dans les HUVECs est associée avec une diminution de la sécrétion de molécules pro-inflammatoires telles qu'IL-6, IL-8, CXCL1, MIP-2 (Macrophage Inflammatory Protein-2 ou CXCL2). Ces résultats confirment l'implication du TGIF1 dans l'évolution de la pathologie fibrotique.

#### d. Autre acteur de la fibrose: l'endothéline-1

L'endothéline-1 (ET-1) est connue pour être le peptide vasoconstricteur le plus puissant de l'organisme. Ce peptide possède également des propriétés mitogéniques. L'ET-1 est l'isoforme majoritaire et est principalement produite par l'endothélium vasculaire de manière constitutive. Sa synthèse n'est cependant pas restreinte aux cellules endothéliales et sa production est aussi observée par les CMLVs, par les cellules épithéliales intestinales, les macrophages ou encore les mastocytes. L'action de l'ET-1 passe par sa fixation sur ses récepteurs : l'ET<sub>A</sub> exprimé à la surface des CMLVs et ET<sub>B</sub> retrouvé à la surface des cellules endothéliales. De manière intéressante, une augmentation du taux sérique de l'ET-1 a été observée chez des patients diabétiques associée au développement de fibrose cardiaque. Il a été montré que l'expression de l'ET-1 est nécessaire à l'acquisition d'un phénotype myofibroblastique par les fibroblastes en culture (Shi-wen et al. 2007). De fait, l'ET-1 est apparue comme un acteur potentiel du processus fibrotique. Cette hypothèse a par ailleurs été confirmée *in vivo* via l'utilisation d'un modèle de souris déficientes pour ce peptide spécifiquement dans le compartiment endothélial (souris ET-1<sup>flx</sup>-Tie2-Cre). Les résultats obtenus dans cette étude ont permis de montrer que la délétion de l'ET-1 est associée à une réduction du processus de transition endothélium-mésenchyme et une réduction globale de la fibrose cardiaque des animaux (Widyantoro et al. 2010). Enfin, d'autres travaux menés au laboratoire ont permis de relier le système des endothélines à l'irradiation et plus précisément, la présence d'un profil ET<sub>A</sub> dans des tissus de patients atteints de rectite radique. Cependant, l'inhibition pharmacologique des récepteurs aux endothélines n'a pas permis de réduire le développement de la fibrose radique dans un modèle préclinique de rectite radique chez le rat (Jullien et al. 2009). D'autres études s'avèrent nécessaires afin de mieux caractériser le rôle de l'ET-1 dans la réponse gastro-intestinale aux rayonnements.

#### 4. Modélisation de la fibrose radio-induite chez l'animal

La difficulté d'accès, la rareté des tissus radiques humains et l'impossibilité de réaliser des études cinétiques à partir de ces tissus constituent les principales limites dans l'étude de la réponse des tissus sains aux rayonnements. Il était donc nécessaire de créer des modèles animaux capables de recréer des lésions radio-induites comparables à celles observées en clinique.

Le modèle d'irradiation corps entier a certainement été le plus utilisé jusqu'à ce jour dans l'étude des conséquences des rayonnements sur les dommages intestinaux. Bien que ce modèle ait permis de poser les bases de la compréhension des mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans les phases précoces de la pathogenèse radique, il ne permet pas d'étudier les lésions radiques chroniques puisque les doses fibrosantes sont incompatibles avec la survie des animaux à long terme. C'est pourquoi, d'autres modèles ont été mis en place faisant appel à l'utilisation de méthodes d'irradiation plus précises et ciblées sur l'intestin. Ainsi, deux modèles d'irradiation sont aujourd'hui utilisés chez la souris et le rat : le modèle d'**irradiation colorectale** pour étudier la rectite radique ; le modèle de l'**anse grêle extériorisée** afin de modéliser l'entérite radique (**Tableau 3**).

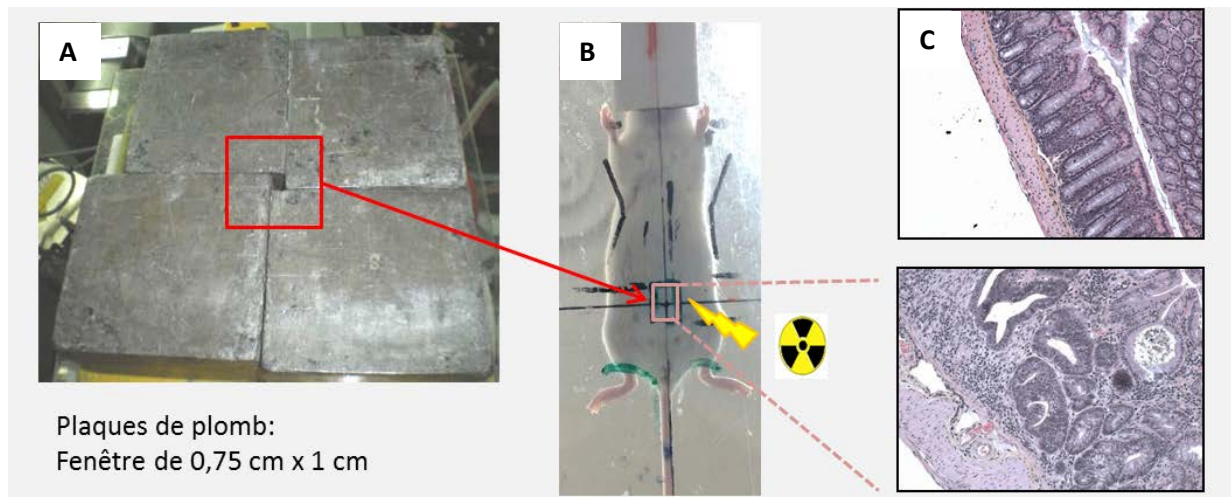
Type d'effets	Rat		Souris	
	Aigus	Aigus/Tardifs	Aigus	Aigus/Tardifs
<b>Intestin grêle</b>	10-18 Gy	21 Gy	8 Gy	19 Gy
<b>Côlon</b>	> 20 Gy	27 Gy	> 20 Gy	27 Gy

**Tableau 3 : Modélisation des effets aigus et tardifs au niveau de l'intestin grêle et du côlon.**

#### **a. Modèle d'irradiation colorectale**

En pratique, l'irradiation colorectale est effectuée par un simple positionnement de l'animal, à l'aide de repères anatomiques, au niveau d'un champ d'exposition délimité à la fenêtre d'irradiation, permettant ainsi l'irradiation ciblée de la région colorectale (**Figure 14**). Ce modèle est applicable chez la souris et le rat, et est facile à mettre en œuvre puisque il ne nécessite aucun acte chirurgical. De plus, le colorectum étant une partie fixe du tube digestif dans l'abdomen, cette configuration permet la réalisation d'irradiations itératives et donc, la comparaison entre les modèles d'irradiation en dose unique et fractionnée. Les travaux pionniers d'E. Travis ont permis une caractérisation histologique précise des dommages aigus et tardifs pour des doses comprises entre 15 et 35 Gy. Ces travaux ont notamment mis en évidence la perte sévère du compartiment épithélial pour des doses supérieures à 20 Gy en dose unique, et qu'au-delà de cette dose la dénudation des cryptes s'avère irréversible. De plus, la cinétique d'apparition des dommages radio-induits apparaît dose-dépendante dans ce modèle ([Followill et al. 1993](#)). D'autre part, ces mêmes auteurs ont pu confirmer que les

dommages radio-induits étaient moindres lors de l'utilisation d'une irradiation fractionnée (2 x 14,75 Gy) par rapport à une dose unique (doses supérieures à 20 Gy) (Followill et al. 1993; Followill et al. 1995).

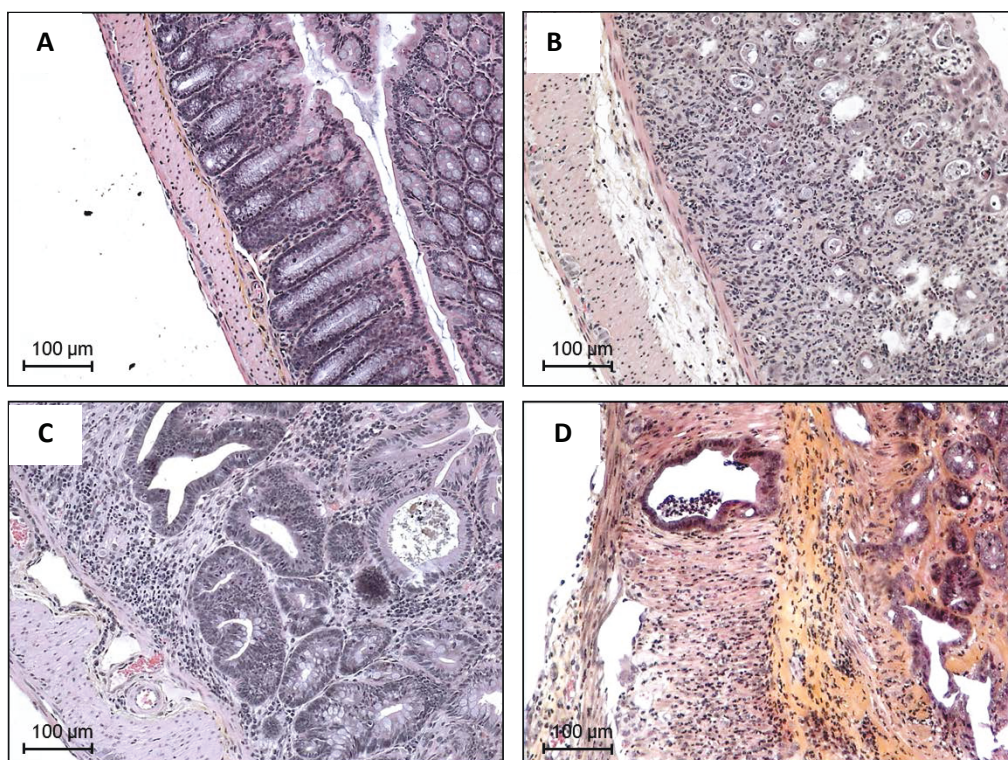


**Figure 14** : Dispositif d'irradiation colorectale chez la souris : modélisation de la rectite radique. Source de cobalt 60, rayons  $\gamma$  (27 Gy, 0,73 Gy/min, ICO 4000). (A) Fenêtre d'irradiation de 0,75 cm x 1 cm. (B) Positionnement de l'animal anesthésié sous isoflurane sur une plaque en fonction de repères anatomiques. (C) Lésions histologiques obtenues 3 jours après une irradiation colorectale en dose unique (photo en bas) en comparaison avec un tissu contrôlé.

Le modèle utilisé au cours ce travail de thèse correspond au modèle d'irradiation colorectale en dose unique de 27 Gy chez la souris FVB/N. Au niveau histologique, ce modèle est caractérisé par le développement de dommages tissulaires précoces, observés dès 3 jours avec une persistance jusqu'à 14 semaines après l'exposition, temps pour lequel une fibrose est observée. La structure du côlon chez la souris est similaire à celle décrite précédemment chez l'homme, à savoir la présence d'une succession de cryptes reposant sur une lame basale et une sous muqueuse. Parmi les premiers dommages tissulaires observés, la dénudation des cryptes opère dès les premiers jours après l'exposition et est associée à une désorganisation de l'architecture de la muqueuse (**Figure 14 B**). Par la suite, la mise en place de la réponse inflammatoire est initiée via le recrutement des macrophages, des granulocytes neutrophiles et des lymphocytes. Ces derniers sont par ailleurs retrouvés 14 jours après l'exposition, temps correspondant au pic inflammatoire dans ce modèle d'irradiation (**Figure 14 C**). Quelques reprises glandulaires peuvent être observées même si la structure reste



anarchique et l'épaississement de la lamina propria persiste. Le point tardif correspond à un temps de 3 mois après irradiation. A cette période, les dommages chroniques sont comparables à ceux observés chez l'homme, à savoir une persistance de l'érosion muqueuse associée à une infiltration collagénique localisée par la coloration au safran (**Figure 15 D**). Enfin, la présence de cryptes régénérantes ectopiques peut être observée (colitis cystica profunda), pour des temps tardifs, associée à une dystrophie de la muscularis propria (épaississement et inflammation des couches musculaires).



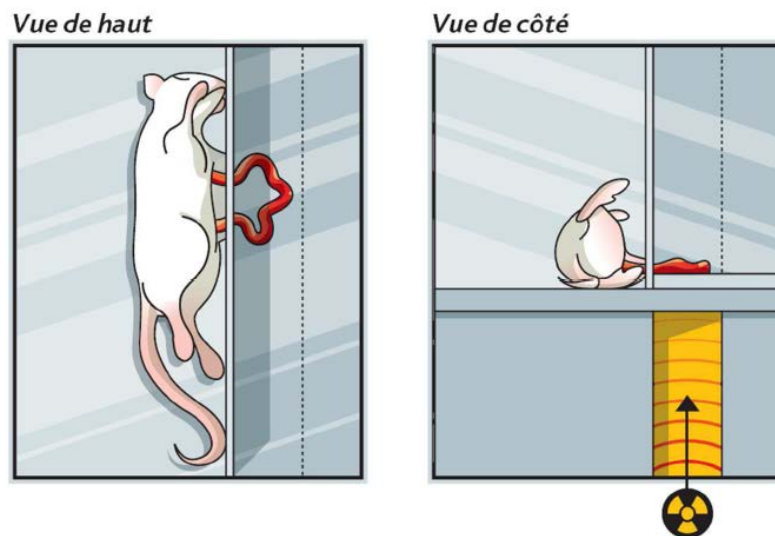
**Figure 15 :** Modélisation de la fibrose colorectale radio-induite chez la souris. Coloration Hémalum Eosine Safran (HES) coupes de rectum de souris Tie2-GFP contrôle (A), 3 jours (B), 14 jours (C) et 3 mois (D) après une exposition à une dose unique de 27 Gy.

#### **b. Irradiation localisée de l'intestin grêle : modèle de l'anse extériorisée**

Ce modèle d'entérite radique est aussi bien utilisé chez la souris que chez le rat ([Rubio et al. 1996](#); [Zheng et al. 2000](#)). Contrairement au côlon, l'intestin grêle constitue la partie mobile du tube digestif dans l'abdomen et ne permet donc pas l'irradiation d'une seule anse à forte dose, nécessaire au développement de la fibrose. L'irradiation localisée nécessite donc dans ce cas l'isolation par chirurgie de la zone à traiter. Cette étape débute par une



laparotomie abdominale, puis une extériorisation de l'anse intestinale qui est placée dans le champ d'irradiation (dose unique de 19 Gy) (Zheng et al. 2000). Le corps de l'animal est tenu hors du champ d'irradiation par une plaque de plexiglas (Figure 16). Lorsque l'irradiation est complète, l'anse intestinale est replacée dans la cavité abdominale et l'animal est ensuite suturé. Ce modèle est couramment utilisé au laboratoire et a notamment été la base de l'étude du rôle de la protéine PAI-1 dans le développement de l'entérite radique (Abderrahmani et al. 2009; Rannou et al. 2015).



**Figure 16** : Modélisation de l'entérite radique chez la souris : irradiation localisée d'une anse d'intestin grêle.

La principale limite de ce modèle concerne l'impossibilité de délivrer des doses en fractionnées. De ce fait, un modèle de scrotalisation a été mis en place chez le rat dans les années 1980 pour étudier l'effet du fractionnement sur l'intestin grêle. Dans ce modèle, une anse d'intestin grêle (iléon distal) est transposée dans le scrotum après castration bilatérale chez le rat (Hauer Jensen et al. 1983; Hauer-Jensen et al. 1998). Ainsi, l'irradiation localisée et fractionnée est rendue possible en irradiant uniquement le segment présent dans le scrotum sans toucher d'autres structures vitales. Les travaux de M. Hauer-Jensen ont été les premiers à étudier les conséquences d'une irradiation fractionnée sur l'intestin grêle (dose totale de 56 Gy) (Hauer-Jensen et al. 1988). Leurs travaux ont aussi permis de caractériser les lésions aiguës (2 semaines) et tardives (26 semaines) dans un modèle d'irradiation en dose unique de 12 et 21 Gy (Hauer-Jensen et al. 1998). De façon globale, ces premiers travaux ont participé à améliorer les connaissances sur les conséquences de l'irradiation fractionnée/dose unique au

niveau de l'intestin grêle. La principale limite du modèle de scrotalisation est qu'il n'est techniquement pas applicable à la souris (taille trop petite) qui est le modèle de prédilection utilisé pour la transgénèse.

## 5. Recherche sur les thérapeutiques anti-fibrosantes : quelles cibles privilégier ?

La question autour d'une possible réversion de la fibrose alimente encore aujourd'hui de nombreux débats au sein de la communauté scientifique. Par ailleurs, il est important de souligner que le processus de cicatrisation reste nécessaire et bénéfique lorsqu'il est contrôlé et limité dans le temps. Il reste aujourd'hui à identifier les mécanismes précis intervenant dans le maintien de l'activation cellulaire qui pourraient être utilisés chez les patients afin de stopper la synthèse de MEC de manière durable. En clinique, de nombreuses molécules sont actuellement testées avec l'obtention de résultats encourageants chez les patients. Il serait cependant fastidieux d'énumérer toutes les possibilités thérapeutiques appliquées, c'est pourquoi seuls les principaux exemples de voies/cibles seront présentés par la suite.

### a. Limiter le dépôt de matrice extracellulaire

#### ✓ Inhibition de la voie TGF- $\beta$

Les antioxydants : Les travaux de S. Delanian menés depuis les années 1990 ont été novateurs dans ce domaine et ont pu démontrer les effets bénéfiques des antioxydants vis-à-vis de la fibrose radio-induite aussi bien *in vitro* que chez l'homme. Les résultats obtenus dans ces études ont entre autres permis de montrer l'existence d'une déficience endogène de l'enzyme anti-oxydante MnSOD (Manganese-dependant SuperOxide Dismutase) dans des fibroblastes isolés à partir de biopsies cutanées de patients atteints de fibrose cutanée radio-induite. En revanche, le traitement de ces cellules par une SOD Cu/Zn exogène, la forme liposomale (LipoSOD), permet de compenser et de stimuler l'activité de la MnSOD endogène et est associée avec la diminution de l'expression des acteurs pro-fibrogéniques à savoir, le TGF- $\beta$ 1 et les TIMPs (Delanian et al. 2001). Des résultats similaires ont été obtenus chez l'homme où l'administration de LipoSOD favorise la réduction de la fibrose cutanée chez certains patients (Delanian et al. 1994). Toutefois, cette étude a été menée sur un faible nombre de patients et ce traitement s'avère bénéfique seulement pour les patients traités par une radiothérapie seule.

Par la suite d'autres molécules antioxydantes ont été étudiées telles que la Pentoxifyline (un inhibiteur non spécifique des phosphodiesterases) et la vitamine E. L'administration concomitante de ces deux molécules a révélé une atténuation du phénotype fibrotique des CMLs primaires provenant de tissus radiques ([Hamama et al. 2012](#)). Cet effet passe entre autres par la réduction de la production de ROS et l'inhibition de l'expression du TGF- $\beta$ 1. L'utilisation de ce traitement en clinique a montré des résultats bénéfiques avec une réduction significative de la fibrose superficielle de la peau en 6 mois chez 24 patientes traitées pour un cancer du sein ([Delanian et al. 2003](#)). Des résultats similaires ont été observés chez des patients atteints de rectite radique, où une réduction du grade de la pathologie a été observée chez 71% des patients ayant reçu ce traitement ([Hille et al. 2005](#)). L'efficacité de ces traitements s'avère toutefois relative et certains patients ne répondent pas à l'utilisation de ces molécules. Ceci peut s'expliquer par la présence de facteurs stochastiques et du stade d'avancement de la fibrose.

Inhibition spécifique de la voie des Smads : La voie des Smads étant la principale cible du TGF- $\beta$ 1, la génération de modèles animaux déficients pour cette protéine a permis de montrer un rôle bénéfique de l'inhibition de ces effecteurs ([Zanninelli et al. 2006](#)). Les résultats obtenus ont montré que la perte de l'expression de Smad3 est associée avec la diminution du dépôt de collagène de type I et de la fibronectine dans des modèles de fibrose pulmonaire induite par la bléomycine ([Zhao et al. 2002](#)), et de fibrose cutanée radio-induite ([Flanders et al. 2002](#); [Flanders et al. 2008](#)). Des inhibiteurs spécifiques de Smad3 (SIS3) ont également été développés et agissent en bloquant la phosphorylation de Smad3 induite par le TGF- $\beta$ 1. *In vitro*, l'ajout de cette molécule bloque l'activation des fibroblastes et diminue la synthèse de MEC par ces derniers ([Rosenbloom et al. 2013](#)). Chez l'homme, l'effet bénéfique de la Pentoxifyline est corrélé avec une inhibition de la cascade des Smad2/3/4 et de la fibrose, soulignant l'intérêt de l'inhibition spécifique de la voie canonique du TGF- $\beta$  ([Tampe et al. 2014](#)).

Les anticorps monoclonaux et protéines recombinantes : L'utilisation d'anticorps monoclonaux s'avère également encourageante. Actuellement, les ciblage du TGF- $\beta$  et du CTGF sont respectivement en cours d'essais cliniques de phase I et II aux Etats-Unis chez des patients atteints de fibrose rénale. Concernant le TGF- $\beta$ , deux types d'anticorps ont été développés et sont actuellement testés en clinique, le Métélimumab, qui inhibe l'activité du TGF- $\beta$ 1 et du TGF- $\beta$ 2, et le Frésolimumab qui bloque l'activité du TGF- $\beta$ 1 ([Tampe et al.](#)

2014). Toujours dans le but de bloquer l'action du TGF- $\beta$ , d'autres anticorps ont été créés (STX-100) pour cibler de façon spécifique l'intégrine  $\alpha_5\beta_6$  et ainsi prévenir l'activation du complexe TGF- $\beta$  latent (Akhurst et al. 2012; Rosenbloom et al. 2013). Enfin, Zheng *et al* ont mis au point une protéine de fusion composée de la partie soluble du T $\beta$ R-II fusionnée au fragment Fc d'origine murine (T $\beta$ R-II : Fc). Ces auteurs ont pu montrer que l'administration préventive du T $\beta$ R-II : Fc (2 jours avant) et post-irradiation (6 semaines) favorise la diminution des atypies épithéliales, permet de restaurer/préserver l'intégrité de la muqueuse digestive (augmentation de la surface muqueuse) et est associée avec une réduction globale de la fibrose dans un modèle d'entérite radique chez la souris (Zheng et al. 2000).

Utilisation d'agents pharmacologiques: En clinique, la première drogue antifibrosante approuvée en Europe est le Pirfenidone. L'effet de cette molécule passe par un effet anti-oxydant ainsi qu'une régulation de l'expression génique de multiple cytokines telles que le TGF- $\beta$ 1, le PDGF, le TNF- $\alpha$  ou encore le bFGF. Son utilisation chez des patients atteints de fibrose pulmonaire idiopathique a permis l'obtention de résultats encourageants. Une amélioration de la fonction pulmonaire et de façon générale, l'augmentation la survie de ces patients ont été observées (Akhurst et al. 2012). De même, lors d'une étude pilote réalisée chez des patients atteints de fibrose cutanée radio-induite, son utilisation est associée avec une amélioration modeste de l'état général des patients (Simone et al. 2007). Bien que ces résultats soient encourageants, ils restent mitigés en fonction des patients et d'autres études doivent être effectuées sur de plus grandes cohortes afin de valider ces observations.

#### ✓ Ciblage de la voie TGF- $\beta$ non-canonique Rho/ROCK

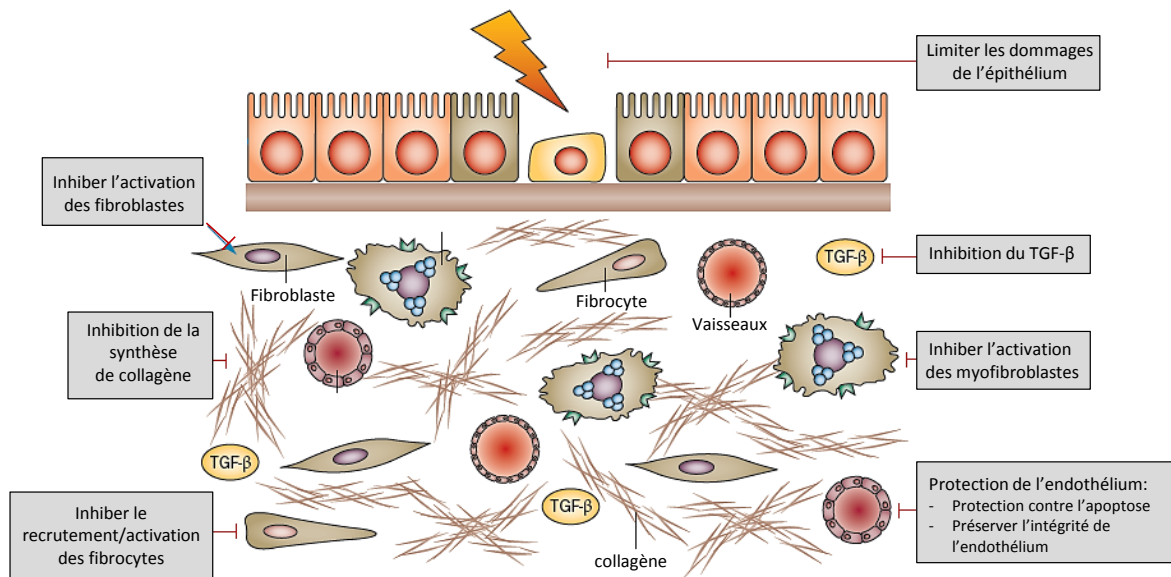
Le ciblage de cette voie moléculaire constitue une approche thérapeutique intéressante de par son implication majeure dans le développement de la fibrose via le CTGF. En effet, il a été mis en évidence que les GTPases de la famille Rho/ROCK sont surexprimées dans des CMLs isolées à partir de tissus de patients atteints d'entérite radique (Bourgier et al. 2005). De plus, une inhibition spécifique des protéines ROCK permet de reverser le phénotype fibrotique des CMLs. Cette réversion est associée avec la diminution significative de l'expression de gènes associés à la fibrose. D'un point de vue mécanistique, la diminution de l'expression des protéines Rho entraînerait la déstructuration du réseau d'actine et la diminution de l'expression du CTGF et donc *in fine*, de la synthèse du collagène I. D'autres études *in vivo* ont pu confirmer l'importance de cette voie Rho-ROCK-MRFT dans un modèle

de fibrose pulmonaire. L'administration d'un inhibiteur des ROCK et la création d'un modèle de souris déficientes pour le gène *Mrft* sont associées avec une réduction de la fibrose pulmonaire idiopathique (Riches et al. 2015). Bien que ces résultats soient en faveur d'une inhibition du phénotype fibrotique, la limite d'une thérapie via des inhibiteurs des ROCK concerne d'une part la spécificité de l'inhibition, et d'autre part leurs fonctions multiples au sein de la cellule dont la perte pourrait engendrer des effets secondaires importants (Van De Water et al. 2013).

✓ **Le BMP-7 : réversion de la fibrose**

Le BMP-7 (Bone Morphogenic Protein-7) ou OP-1 (Osteogenic Protein-1) appartient à la superfamille du TGF- $\beta$ . Il s'agit d'une cytokine multifonctionnelle qui a été d'abord identifiée dans la formation ectopique du cartilage et de l'os *in vivo*, puis dans la formation des reins au cours de l'embryogenèse chez les mammifères (Swencki-Underwood et al. 2008). Son rôle anti-fibrotique a été démontré dans un premier temps dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de fibroses rénales aiguës et chroniques. Par la suite, des études mécanistiques ont révélé que le BMP-7 était capable de reverser le phénotype fibrotique via l'inhibition du processus d'EMT et l'induction du processus de transition mésenchyme-épithéliale (TEM) (Zeisberg et al. 2005). *In vivo*, l'administration de BMP-7 recombinante humaine (rhBMP-7) est associée avec une diminution de la synthèse de collagène de type I et de fibronectine chez un modèle murin de fibrose cardiaque. D'après les résultats de cette étude, cet effet passe par une inhibition du processus d'EndoMT induit par le TGF- $\beta$ 1 (Zeisberg et al. 2007b). De plus, des résultats similaires ont été obtenus dans un modèle de fibrose intestinale induite par le TNBS (2, 4, 6-TriNitroBenzene Sulfonic acid) chez la souris, où l'administration de rhBMP-7 réduit de manière significative le dépôt de collagènes dans les tissus par inhibition de l'EMT (Flier et al. 2010).

Bien que le BMP-7 soit déjà utilisé en clinique dans un contexte de cicatrisation osseuse (Kanakaris et al. 2008), son utilisation systémique dans le cas de fibrose s'avère peu confortable au vue de la quantité nécessaire au traitement et à la limite dans la quantité pouvant être produite. C'est pourquoi d'autres molécules (THR-184) possédant des caractéristiques biologiques et biochimiques analogues ont été développées et sont actuellement testées en essais cliniques de phase II aux Etats-Unis dans un contexte de fibrose rénale (Swencki-Underwood et al. 2008; Tampe et al. 2014).



**Figure 17** : Exemples de stratégies thérapeutiques pour réduire les dommages radio-induits aux tissus sains (adapté à partir de Tampe *et al.* 2014).

### b. Autre stratégie : cibler les mécanismes cellulaires précoces

Bien que la plupart des stratégies thérapeutiques actuelles visent en premier lieu à reverser le processus fibrotique (**Figure 17**), d'autres hypothèses permettent d'envisager des approches thérapeutiques différentes. En ce sens, la notion d'**effet conséquentiel** alimente depuis les années 80 le débat quant à l'existence d'un lien de causalité direct entre la sévérité de l'atteinte aiguë et le développement de séquelles tardives (Peters *et al.* 1988; Dorr *et al.* 2001). Différentes études par méta-analyses ont pu soutenir cette hypothèse à partir de données cliniques. Wang *et al* ont montré l'existence d'une corrélation entre la sévérité des lésions tardives et celle des atteintes aiguës chez des patientes ayant été traitées pour carcinome cervical (Wang *et al.* 1998a). De même, des patients présentant des lésions aiguës sévères du rectum, suite à un traitement pour tumeur prostatique, auraient un risque de 40% de développer des rectites radiques chroniques à 4 ans, contre 16% pour les patients avec des lésions aiguës faibles ou modérées (Heemsbergen *et al.* 2006). Jerezek-Fossa *et al* ont quant à eux mis en évidence l'apparition de lésions rectales tardives chez 52% des patientes présentant d'importants dommages aigus suite à une radiothérapie pour un cancer de l'endomètre, contre seulement 21% des patientes n'ayant pas eu de toxicité aiguë (Jerezek-Fossa *et al.* 2002). Malgré ces observations, l'existence de cet effet conséquentiel reste à être

démontrée de façon formelle chez l'homme. Une modulation de la réponse précoce permettrait donc, d'après ce concept, de diminuer les atteintes tardives.

C'est dans cette volonté que certaines stratégies s'orientent vers le ciblage de mécanismes précoces qui pourrait permettre de limiter l'évolution de la pathologie vers la fibrose. Comme explicité précédemment, la mort du compartiment souche à la base des cryptes et la perte de l'intégrité de la barrière intestinale font partie des événements précoces observés après irradiation. La protection de ce compartiment constitue donc une approche attrayante pour limiter les dommages radio-induits précoces et *in fine*, réduire le processus fibrotique. De même, l'activation et la mort apoptotique des cellules endothéliales jouent un rôle primordial dans l'initiation et le développement de la fibrose digestive radio-induite. C'est pourquoi la préservation de l'intégrité du réseau vasculaire constitue également une approche d'intérêt dans la prévention de la formation d'un microenvironnement hostile généralement observé après irradiation (**Figure 17**).

Protection de la muqueuse digestive : L'utilisation de Glucagon-Like Peptide-2 (GLP-2, un peptide intestinotrophique), a révélé un potentiel thérapeutique encourageant dans un contexte d'entérite radique chez le rat. De manière intéressante, les administrations préventive et curative de GLP-2 aux animaux favorisent la réduction de l'ulcération muqueuse et réduisent la sévérité de l'entérite radique aussi bien pour les dommages aigus (2 semaines après une exposition à 16, 5 Gy) que chroniques (15 semaines après une exposition à 19 Gy) ([Torres et al. 2007](#)). Plus récemment, Kantara *et al* ont quant eux démontré le rôle bénéfique d'un autre peptide, le TP508 ou Chrysalin, vis-à-vis du SGI chez la souris. Ces auteurs ont pu montrer qu'une seule injection curative de TP508 était capable de prévenir la dissociation précoce des cryptes intestinales et coliques via une surexpression de la E-cadhérine, et une stimulation de la prolifération des cellules souches 24h et jusqu'à 9 jours post-irradiation. La préservation de l'intégrité de la muqueuse générée par le TP508 permet également une augmentation de la survie de 30,8% des animaux ([Kantara et al. 2015](#)).

Protection de l'endothélium vasculaire : Le bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) est un facteur de croissance exprimé de manière ubiquitaire au niveau des membranes basales des vaisseaux sanguins de taille intermédiaire et de grand diamètre. Il est en revanche peu détecté dans les capillaires ce qui pourrait expliquer en partie la radiosensibilité du compartiment microvasculaire ([Paris et al. 2001](#)). En plus de son pouvoir angiogénique, le rôle protecteur du



bFGF vis à vis des rayonnements a d'abord été mis en évidence *in vitro* dans un modèle de cellules endothéliales aortiques bovines (BAECs) (Haimovitz-Friedman et al. 1991; Haimovitz-Friedman et al. 1994a). En effet, en présence de bFGF dans le milieu de culture favorise la survie des cellules irradiées (5 Gy) et une réduction de l'apoptose. Ces résultats ont été confirmés *in vivo* dans un modèle de pneumonie radio-induite chez la souris où les injections de bFGF préventive et 2 heures post-irradiation (20,5 Gy en thorax entier), sont associées avec une diminution de la mortalité des animaux (28% de mortalité pour les animaux traités avec du bFGF contre 64% pour les animaux contrôles). Ces mêmes auteurs ont pu montrer que cet effet passe essentiellement par la diminution de l'apoptose radio-induite des cellules endothéliales (Fuks et al. 1994). Un mimétique du bHGF (Refanaline<sup>®</sup>) est actuellement utilisé en clinique aux Etats-Unis dans un contexte de fibrose hépatique (Tampe et al. 2014). D'autres facteurs de croissance comme le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), inhibent la mort des cellules endothéliales et préviennent les dommages intestinaux radio-induits (Okunieff et al. 1998).

### c. Thérapie moléculaire : ciblage des micros ARN

Ces dernières années les stratégies thérapeutiques se sont orientées vers la recherche de biomarqueurs spécifiques afin d'améliorer la prise en charge thérapeutique des patients (Cui et al. 2011). Dans ce contexte, les micros ARN ou miRNA, rassemblent un certain nombre d'avantages pouvant être utilisés comme biomarqueurs de prédiction des dommages radio-induits. Les miRNA (ou miR) sont des petits ARN non codants de 18 à 25 nucléotides. Ils sont impliqués dans la régulation spécifique de l'expression d'ARNm cibles et affectent différentes fonctions cellulaires telles que la prolifération, la différenciation ou encore l'apoptose. Ces derniers sont retrouvés de manière spécifique dans les tissus et également sous forme circulante. De manière intéressante, leur expression est souvent altérée et est caractéristique d'un contexte pathologique donné, comme par exemple dans le cas du cancer colorectal où certains miRNA sont exprimés de manière aberrante (Toiyama et al. 2015). Concernant l'irradiation, il a été montré chez la souris que pour des doses de 0,5, 2 et 10 Gy corps entier, il existe une signature spécifique à 6 et 24h post-irradiation, avec une détection des miRNA possible dans le plasma (Cui et al. 2011). L'efficacité thérapeutique des miRNA a été mise en évidence dans plusieurs modèles et notamment dans un modèle de cancer pulmonaire chez la souris où l'administration systémique préventive du miR-200 est associée



à une augmentation de la production de ROS, une meilleure sensibilisation des cellules à l'irradiation et à une réduction du volume tumoral (Cortez et al. 2014). Il a de même été montré *in vitro* que l'inhibition de l'expression du miR-210, via la transfection d'un antagonomiR, est associée avec une baisse de l'expression du TGF- $\beta$ 1, du CTGF, de PAI-1 et de la fibronectine-1 (FN-1) dans des CMLs cultivées en condition hypoxique (Hamama et al. 2014). Une des principales limites de cette approche concerne la spécificité de la signature miRNA puisque ces derniers peuvent s'exprimer dans d'autres pathologies. Certaines stratégies mises en place afin de pallier à cette limite consistent à réaliser une signature des miRNA circulants et ceux présents dans le tissu pathologique et d'effectuer une comparaison entre ces deux signatures pour augmenter la pression de sélection des miRNA (Toiyama et al. 2015). Ce dernier point fait par ailleurs l'objet d'un projet de recherche au laboratoire qui consiste à identifier une signature spécifique des miRNA après irradiation dans un contexte d'entérite radique.

#### **d. Thérapie cellulaire et les cellules souches mésenchymateuses**

La thérapie régénérative basée sur l'effet anti-fibrosant potentiel des cellules souches constitue une alternative thérapeutique attrayante. Les cellules souches mésenchymateuses (CSM), originellement isolées à partir de la moelle osseuse, sont des progéniteurs pluripotents qui participent au maintien et à la régénération de divers tissus conjonctifs. Ces cellules sont actuellement identifiées comme un candidat de choix dans la réduction des dommages chroniques de type entérite ou rectite radique. Ceci s'explique entre autres par leur capacité d'adaptation à leur environnement et plus particulièrement, à la modulation de leur sécrétome permettant d'influencer directement le microenvironnement (Chang et al. 2015). Néanmoins, l'ensemble des mécanismes par lesquels les CSM sont capables d'influencer le phénotype des cellules avoisinantes reste à être élucidé. On sait aujourd'hui que cet effet passe en partie par la régulation de l'expression des TLR à la surface des cellules immunitaires, et à la diminution de la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires de type INF- $\gamma$  et TGF- $\beta$ 1 (Usunier et al. 2014). Ainsi, les CSM possèdent des propriétés immunomodulatrices en favorisant le switch phénotypique des cellules immunitaires d'un état pro vers un état anti-inflammatoire. Cet effet a été observé en clinique et s'est avéré bénéfique dans des contextes de maladie du greffon contre l'hôte (GVHD), de maladies inflammatoires du tube digestif, de lupus érythémateux systémique ou encore d'arthrite (Chang et al. 2015). De même, des résultats

encourageants ont été obtenus dans des modèles précliniques chez la souris et le porc concernant la diminution des dommages colorectaux radio-induits. Ces travaux ont révélé que des injections systémiques de CSM après irradiation favorisent la réduction de l'inflammation muqueuse, une diminution de l'apoptose des cellules souches intestinales, une accélération de la re-épithélisation, une diminution de la surface fibreuse associée à une restauration globale des fonctions de l'épithélium intestinal (Semont et al. 2010; Linard et al. 2013). Chez l'homme, l'accident d'Epinal (France) a conduit à un surdosage de 20% chez 24 patients traités pour un cancer de la prostate entre 2004 et 2006 et a été à l'origine d'une augmentation sans précédent du nombre de rectites radiques sévères (Peiffert et al. 2007). La mise en place d'un traitement spécifique (protocole compassionnel) via la transplantation allogénique de CSM a permis une réduction des hémorragies rectales associée à un effet analgésique et anti-inflammatoire chez un patient 6 mois après les injections (Voswinkel et al. 2013). Les résultats obtenus au cours de ces essais cliniques sont encourageants, toutefois des interrogations persistent quant aux potentiels effets secondaires des injections systémiques sur le long terme. En effet, la stabilité génomique des CSM après injection reste à être évaluée tout comme leur rôle potentiel dans la tumorigénèse. D'autres études s'avèrent donc indispensables afin de mieux caractériser l'action des CSM sur le tissu irradié et notamment caractériser leur effet anti-fibrosant chez l'homme.

Les complications digestives chroniques sont observées chez 5 à 10 % des patients ayant reçu une radiothérapie au niveau de la sphère abdomino-pelvienne. Dans un contexte de rectite radique, la fibrose intestinale radio-induite est identifiée comme une des conséquences tardives invalidantes. Malgré une meilleure prise en compte de ces effets secondaires radio-induits, aucun traitement ne permet à ce jour de stopper ou résorber ce processus cicatriciel pathologique. On sait aujourd'hui que la sévérité de l'atteinte aiguë peut potentiellement être corrélée avec l'apparition de dommages tardifs plus ou moins sévères. C'est pourquoi orienter les axes de recherches vers les mécanismes situés en amont de ce processus pathologique constitue une approche d'intérêt. En ce sens, le développement de moyens permettant de protéger la muqueuse digestive et assurant une préservation du phénotype endothélial s'avère nécessaire.

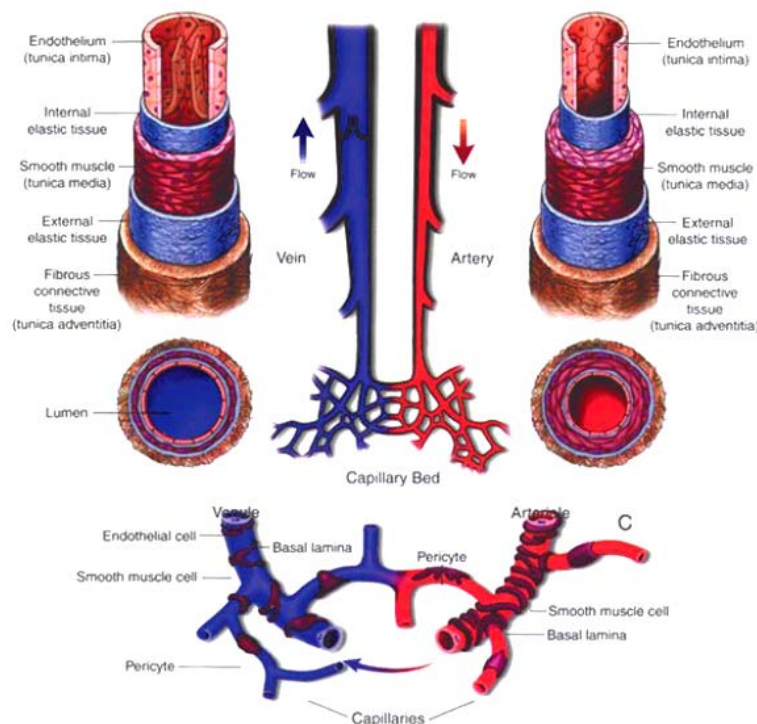
## Chapitre 4. Compartiment vasculaire et dommages radio-induits

L'endothélium vasculaire possède une plasticité cellulaire remarquable qui lui permet de s'adapter rapidement à son environnement et lui confère une multitude de fonctions biologiques. Ce compartiment cellulaire joue un rôle essentiel au cours du développement embryonnaire et participe de manière précoce au remodelage vasculaire. Il assure également la régulation de nombreux paramètres biologiques dont l'homéostasie vasculaire, et peut s'activer en réponse à un stress. Dans un contexte physiologique, les cellules endothéliales participent activement à la régulation de la fluidité du sang, au maintien de la perméabilité vasculaire et favorisent l'état de quiescence des leucocytes circulants. Les étapes de l'activation vasculaire nécessaires à la mise en place de la réponse inflammatoire adaptée sont aujourd'hui bien caractérisées. Toutefois, la présence de dommages vasculaires chroniques constitue un événement majeur dans la réponse des tissus sains aux rayonnements ionisants. Dans ce contexte, l'amélioration des connaissances sur les mécanismes vasculaires impliqués dans l'évolution du processus fibrotique est nécessaire et serait bénéfique pour l'élaboration de nouveaux moyens thérapeutiques permettant de contrôler l'activation endothéliale.

### 1. Structure et fonctions du compartiment vasculaire

L'endothélium est formé d'une monocouche de CE qui tapissent la face interne de l'ensemble des vaisseaux lymphatiques et sanguins de l'organisme (artères, veines, capillaires). L'ensemble des vaisseaux, excepté les capillaires, sont entourés par des cellules murales à savoir les péricytes et les CMLVs. Concernant l'endothélium vasculaire, les CE se situent donc à l'interface entre le sang circulant et la paroi vasculaire et forment un tapis cellulaire compact dont les échanges sont finement régulés. De façon remarquable, les CE possèdent une plasticité particulière qui leur permet de moduler rapidement à la fois leur structure et leurs fonctions en réponse à des stimuli donnés. Ainsi, les CE assurent l'étanchéité vasculaire, mais favorisent dans certaines conditions le passage de protéines/cellules circulantes en dehors des vaisseaux, on parle de perméabilité vasculaire. Au niveau structurel, l'endothélium repose sur une membrane basale riche en collagènes et en glycoprotéines et est entouré de CMLVs qui participent directement à la régulation du flux sanguin. Le système vasculaire se divise schématiquement de deux compartiments : le

compartiment artériel et le compartiment veineux. Sa principale fonction est d'assurer de façon continue l'apport de nutriments et l'oxygénation des organes et des tissus périphériques du corps via la circulation sanguine. La structure des vaisseaux va donc être directement liée à leur rôle biologique (veine ou artère). Au niveau structural, on distingue trois tuniques qui composent les vaisseaux sanguins. Selon un axe lumière-tissu périvasculaire on distingue tout d'abord l'**intima**, qui correspond à la monocouche de cellules endothéliales en contact direct avec le flux sanguin qui repose sur une fine assise conjonctive. L'intima est la seule couche cellulaire dont la composition reste similaire quels que soient la nature et le diamètre du vaisseau (**Figure 18**). L'intima peut néanmoins varier et est par exemple plus épaisse dans les artères élastiques et peut être associée à des CMLs particulières dites myointimales. La **média** est composée exclusivement de CMLs disposées de façon hélicoïdale et de composants extracellulaires de type fibres d'élastine et de collagène. Par ailleurs cette couche est très variable et dépend de la localisation au sein du territoire vasculaire. Dans les artères, la média est séparée de l'intima par une couche interne de fibres d'élastine, et de l'adventice par une couche externe d'élastine. Enfin la couche la plus externe correspond à l'**adventice** qui existe uniquement dans les vaisseaux de gros diamètre. Les vaisseaux de petit calibre de type capillaires, sont uniquement constitués de l'intima et d'une lame basale.



**Figure 18 :** Organisation du réseau vasculaire (d'après Torres-Vasquez *et al.* 2003).

Le réseau vasculaire systémique débute par l'injection sous haute pression de sang oxygéné à partir du cœur dans l'aorte. Cette dernière se divise par la suite en artères puis en artérioles qui formeront un réseau de capillaires au niveau des tissus profonds. Les capillaires assurent les échanges gazeux et de nutriments au niveau des tissus. Le sang riche en dioxyde de carbone et autres déchets retourne ensuite vers le cœur via les veinules qui se rassemblent pour former les veines. Ces dernières assurent le retour du sang vers le cœur qui sera ensuite envoyé au niveau du réseau vasculaire pulmonaire où il sera réapprovisionné en oxygène avant de retourner dans la circulation générale. Concernant le côlon, la partie ascendante et la moitié du côlon transverse sont irriguées par l'artère mésentérique supérieure et le côlon descendant ainsi que le rectum sont irrigués par l'artère mésentérique inférieure.

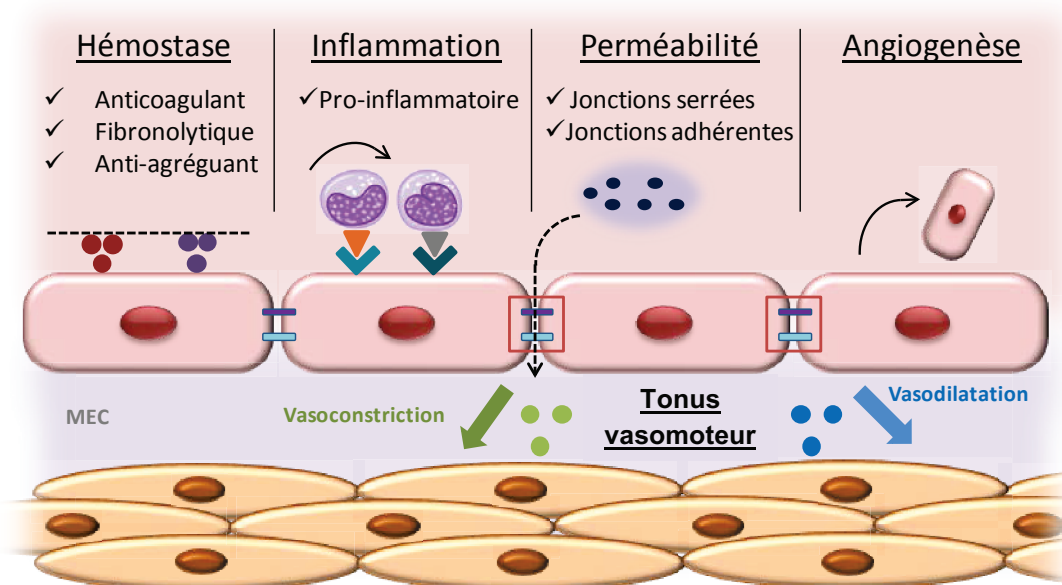
## 2. Compartiment vasculaire et fonctions biologiques associées

La régulation de la fluidité du sang est un processus actif assuré par l'inhibition permanente du processus de coagulation par les CE. Ces dernières jouent donc un rôle clef dans la modulation de **l'hémostase primaire (Figure 19)**. A l'état basal, les CE assurent l'oxygénation et l'apport nutritif des tissus et évitent donc tout mécanisme pouvant entraver la circulation du flux sanguin. Pour se faire, l'endothélium possède une surface anticoagulante, antiagrégante et thromborésistante. Parmi les mécanismes anticoagulants les plus importants, on distingue la synthèse constitutive de la thrombomoduline (TM) par les CE. Cette dernière possède des propriétés anticoagulantes intrinsèques et est soit libérée dans la circulation ou soit associée à la membrane des CE. La TM agit comme un cofacteur en se fixant sur la protéine C et augmente ainsi son activité anticoagulante ([Wang et al. 2007](#)). La surface de l'endothélium est également recouverte d'une structure glycanique dense appelée le glycocalyx contenant des héparanes sulfates qui assurent le maintien du phénotype anticoagulant en se fixant à l'anti-thrombine III et inactive la thrombine. Enfin, les CE sécrètent des inhibiteurs de type TFPI (Tissue Factor Pathway Inhibitors), qui bloquent l'initiation de l'activation de la coagulation. En cas de dommage vasculaire, les CE sont capables de moduler l'ensemble de ces mécanismes et acquièrent un phénotype procoagulant et antifibrinolytique pour permettre la formation du clou plaquettaire.

Le maintien de l'intégrité et de l'étanchéité du tapis endothélial est assuré par la présence d'un important réseau de jonctions intercellulaires. Cela permet aux CE de contrôler finement le passage de molécules présentes dans la circulation sanguine vers l'espace interstitiel, on parle de **perméabilité vasculaire**. La nature des jonctions va déterminer le passage des molécules en fonction de leur taille (**Figure 19**). De façon générale, le maintien de l'endothélium est assuré par les jonctions serrées suite à la fusion plurifocale de protéines transmembranaires de type claudines et occludines ainsi que des jonctions adhérentes (composées de VE-cadhérine). Les jonctions communicantes assurent quant à elles les échanges d'ions et autres petites molécules entre les cellules. Selon le type de capillaire, les CE peuvent comporter des pores transendothéliaux (ou fenêtres) qui favorisent le passage d'efflux ou de protéines à travers le corps cellulaire. La nature et le nombre de jonctions varient en fonction du type de tissu et des besoins de l'organe ([Poher et al. 2007](#)). Enfin, les CE sont également capables de réguler le transport de macromolécules via le transport vésiculaire orchestré par les cavéoles.

Les CE étant en contact direct avec le flux sanguin, elles doivent à la fois assurer la quiescence des leucocytes circulants mais également favoriser leur activation rapide en cas de dommage tissulaire. Elles participent donc directement à l'initiation des **réponses inflammatoire et immunitaire** (**Figure 19**). L'état de quiescence leucocytaire est principalement assuré par la restriction de l'expression de molécules d'adhésion par les CE, de type P-sélectine, au sein de vésicules de sécrétion intracytoplasmiques appelées corps de Weibel-Palades (WPB). A l'état basal, il existe également une faible transcription des gènes codant pour l'E-sélectine, VCAM-1 (Vascular Cell-Adhesion Molecule-1) et ICAM-1 par les CE. On distingue schématiquement deux types d'activation des CE. Tout d'abord l'activation de type I qui est mise en place dans les premières minutes après l'apparition de stimuli. Cette activation fait intervenir les récepteurs couplés aux protéines G tel que le récepteur à l'histamine qui va avoir pour conséquence l'augmentation du taux intracytoplasmique en ions  $\text{Ca}^{2+}$  qui favorise l'exocytose des WPB et la libération de P-sélectine à la surface des CE. L'expression de P-sélectine permet le recrutement des GN et l'expression des CAM favorise l'extravasation de ces derniers à travers la barrière endothéliale. De plus, les CE expriment une autre protéine essentielle à la transmigration des GN et des monocytes, la protéine PECAM-1 (Platelet Cell-Adhesion Molecule-1) ou CD31 ([Gaugler et al. 2004](#)). L'activation de type II se met en place en réponse à des stimuli pro-inflammatoires plus soutenus et

persistants. Le TNF- $\alpha$  et l'IL-1 sont les médiateurs prototypiques de cette réponse et vont initier l'activation des facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et AP-1 (Activator Protein-1). De manière globale, le recrutement des leucocytes et l'intensité de la réponse inflammatoire sont plus soutenus dans le cas d'une activation de type II.



**Figure 19 :** Les principales fonctions de l'endothélium vasculaire.

De par son association étroite avec les CMLVs, l'endothélium intervient directement dans la régulation du **tonus vasomoteur** en libérant des substances vasoactives (**Figure 19**). La synthèse de monoxyde d'azote (NO) par la eNOS (endothelial Nitric-Oxyde Synthase) et de prostacycline (prostaglandine  $I_2$ , PGI $_2$ ) favorise le relâchement des CMLVs et la vasodilatation. Le NO est le produit de catalyse de la L-arginine par l'eNOS. Il s'agit du principal agent vasorelaxant endothélial. Il existe deux formes de eNOS, la forme constitutive dépendante du calcium, et une forme inductible, la iNOS ou calcium-indépendante, activée par les cytokines pro-inflammatoires. Ainsi, le NO produit par les CE va diffuser dans les CMLVs et activer la GMP cyclique qui induit la diminution du stock de calcium intracytoplasmique et donc, inhibe la contraction des CMLVs. Par opposition, en cas de dommages vasculaires, les CE synthétisent de l'angiotensine II, de l'endothéline I (ET-I) ou



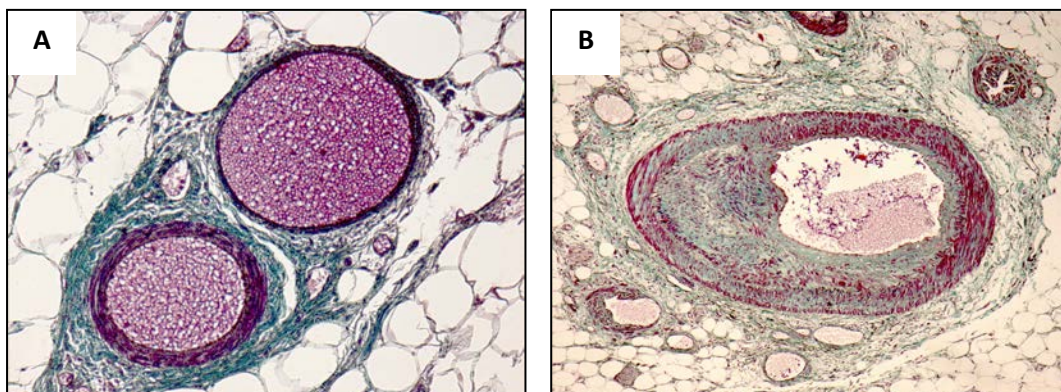
encore du PAF (Platelet Activator Protein-1) qui favorisent un phénotype contractile des CMLVs propice à la formation du caillot (Poher et al. 2007).

Enfin, l'endothélium participe directement à la formation de nouveaux vaisseaux via le processus d'**angiogenèse** (Figure 19). Ce phénomène est caractérisé par la formation de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux préexistants. Il est initié par la dégradation de la lame basale et la MEC environnante. Les CE activées migrent, prolifèrent et assurent la formation d'un nouveau plexus capillaire par bourgeonnement ou par intussusception (subdivision d'un vaisseau) (Milliat et al. 2008a). La formation d'un nouveau réseau vasculaire peut également être la conséquence du recrutement, de la différenciation et de la prolifération des progéniteurs endothéliaux. Ce phénomène est identifié par le terme de vasculogenèse. La formation de nouveaux vaisseaux s'avère en effet nécessaire dans certains contextes, comme lors de la cicatrisation tissulaire afin de soutenir l'action des cellules mésenchymateuses et la synthèse de MEC, ou encore au cours de l'embryogenèse. L'angiogenèse est également associée au cancer et à la dissémination métastatique. Les facteurs angiogéniques les mieux décrits à ce jour sont le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), le FGF2 (Fibroblast Growth Factor 2), l'angiopoïétine-1 et -2 via l'activation du récepteur tyrosine kinase Tie2, et le PDGF.

### 3. Compartiment vasculaire et rayonnements ionisants : quelles conséquences ?

Compte tenu de l'importance de la place du compartiment vasculaire dans la réponse tissulaire aux rayonnements, de nombreux travaux ont été menés afin de mieux comprendre l'impact de l'irradiation sur les changements phénotypiques des CE. Ces travaux ont permis d'une part de mieux caractériser la mort radio-induite des CE et d'autre part, d'identifier les mécanismes impliqués dans l'activation endothéliale. Au niveau histologique, les lésions vasculaires tardives sont caractérisées par une infiltration collagénique au niveau des couches musculaires lisses et une réduction de la lumière due à une hyperplasie néointimale marquant l'atteinte microvasculaire oblitérante (Figure 20). Dans les cas les plus avancés, ces altérations de la vascularisation sont associées à des perturbations de l'intégrité et de l'oxygénation tissulaire (ischémie) qui peuvent évoluer vers la nécrose (Liu et al. 2008).





**Figure 20** : Lésions vasculaires radio-induites. (A) Vaisseaux mésentériques normaux, lumière vasculaire régulière et dépôt collagénique bien organisé. (B) Artériole pathologique avec hyperplasie néointimale et réduction de la lumière du vaisseau. Résection chirurgicale à 5 ou 7 semaines chez des patients traités pour adénocarcinome rectal, radiothérapie préopératoire, dose totale de 45 Gy. Coloration trichrome de Masson ; obj x 40 (d'après l'HDR d'A. François, 2007).

#### a. Apoptose radio-induite des cellules endothéliales

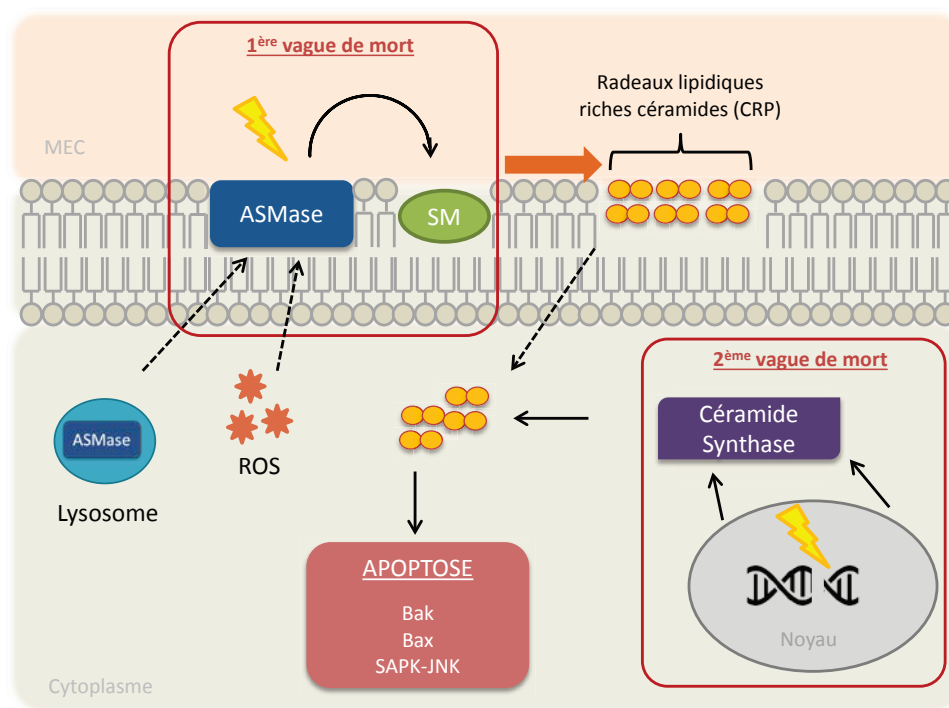
Depuis les premières études menées sur les conséquences des rayonnements sur les cellules de mammifères, il était admis que la mort clonogénique ou mitotique constituait la forme prédominante de mort cellulaire après irradiation. Par la suite un certain nombre d'études ont pu mettre en lumière une relation évidente entre l'irradiation et la mort des CE par apoptose ([Haimovitz-Friedman et al. 1994b](#); [Liao et al. 1999](#); [Gulbins et al. 2003](#)). C'est en 1994 que les travaux de Haimovitz-Friedman *et al* ont confirmé pour la première fois l'importance du processus de mort par apoptose des cellules endothéliales irradiées. Leurs travaux ont montré que l'apoptose des CE était principalement due à la génération de céramides et était donc indépendante des dommages directs à l'ADN. Dans cette étude, l'irradiation de CE aortiques bovines (BAECs) à une forte dose de 10 Gy est associée avec une augmentation de l'apoptose, une diminution rapide du taux de sphingomyéline membranaire, et une augmentation concomitante de céramides ([Haimovitz-Friedman et al. 1994b](#)). Les céramides sont des médiateurs biochimiques qui ont un rôle de second messager et participent à l'induction d'une voie générique d'apoptose induite par le stress. Par ailleurs, il est intéressant de souligner que l'endothélium comprend 20 fois plus de sphingomyélinase acide (ASMase sous forme sécrétée) que n'importe quel autre type cellulaire rendant donc le compartiment microvasculaire particulièrement radiosensible ([Marathe et al. 1998](#)).

*In vivo*, l'utilisation d'un modèle de souris génétiquement déficientes pour l'ASMase (souris ASMase<sup>-/-</sup>), confère une radiorésistance aux animaux et est associée avec une diminution de la mort par apoptose radio-induite des cellules endothéliales microvasculaires pulmonaires et des thymocytes (Santana et al. 1996). Ces précédents résultats ont été confirmés par les travaux de Liao et al qui ont mis en évidence l'existence de deux mécanismes distincts d'apoptose orchestrés par les céramides. Ces auteurs ont entre autres pu montrer que dans les premières secondes qui suivent l'irradiation (5 Gy), l'apoptose radio-induite des CE est gouvernée par une première vague de production de céramides, due à l'activation de l'ASMase acide membranaire (**Figure 21**). Une seconde vague de mort apoptotique est ensuite observée 4 heures après irradiation et correspond à la synthèse *de novo* de céramides via l'activation post-traductionnelle de la céramide synthase (CS) endothéliale (Liao et al. 1999). Les travaux de Ch'ang et al ont démontré via l'utilisation de souris Atm<sup>-/-</sup>, que l'activation de la CS est régulée par la protéine ATM après irradiation (Ch'ang et al. 2005).

En 2001, les travaux de F. Paris ont bouleversé les connaissances sur la cinétique d'évènements cellulaires observés après irradiation. Ces travaux ont tout d'abord confirmé l'existence d'une mort précoce des cellules endothéliales intestinales 1 heure après une irradiation corps entier de 8 et 15 Gy avec un pic observé 4 heures post-irradiation. L'aspect novateur de cette étude concerne la cinétique temporelle de la mort cellulaire après irradiation. En effet, leurs résultats ont révélé pour la première fois que la mort par apoptose des cellules endothéliales précède celle des cellules épithéliales, observée 4 heures post-irradiation (15 Gy). De fait, ces auteurs ont émis l'hypothèse que la mort des cellules épithéliales serait une conséquence de la mort précoce du compartiment endothélial, pour des doses inférieures à 15 Gy (Paris et al. 2001). L'utilisation d'une approche génétique (souris déficientes en ASMase) et l'administration de bHGF ont permis de confirmer cette hypothèse. En effet, la délétion de l'ASMase et l'administration de bHGF permettent la réduction de l'apoptose radio-induite des cellules endothéliales et confèrent une protection des animaux vis-à-vis du SGI.

Enfin, l'importance de l'apoptose endothéliale a également été soulignée dans le contexte tumoral. Il a entre autres été montré que la greffe d'une même tumeur à deux souches de souris wild-type (WT) et ASMase<sup>-/-</sup> est associée à une différence de

radiosensibilité tumorale (Garcia-Barros et al. 2003). En effet, l'inhibition de l'apoptose endothéliale chez les souris *ASMase*<sup>-/-</sup> favorise la croissance et la radiorésistance tumorale (Supiot et al. 2012). Ces résultats mettent en avant la place importante de l'apoptose endothéliale à la fois dans un contexte tumoral, mais également dans l'initiation et la progression de la pathogenèse radio-induite.



**Figure 21 :** Illustration des deux voies de synthèse des céramides et implication dans l'apoptose radio-induite des cellules endothéliales. Première vague de mort précoce (premières secondes post-irradiation), initiée par l'action de la sphingomyélinase acide (ASMase) sur la sphingomyéline membranaire (SM), et génération de céramides impliqués dans le phénomène d'apoptose cellulaire. Deuxième vague de mort (4h post-irradiation) gouvernée par la céramide synthase et la production de céramides pro-apoptotiques.

De par leur nature hydrophobe, les sphingolipides et le cholestérol sont capables de se regrouper entre eux et de former des régions membranaires enrichies en composés lipidiques appelées **radeaux lipidiques** ou **lipid rafts** (Gulbins et al. 2003). Ces derniers jouent un rôle majeur dans l'amplification et l'activation concomitante de voies de signalisation en influençant la distribution de protéines/récepteurs sur une faible surface membranaire. La relation majeure entre les rafts et l'apoptose endothéliale a été mise en évidence à la fois dans des modèles *in vitro* et *in vivo*. Dans ces modèles, l'inhibition de l'ASMase et des céramides

(siRNA et d'anticorps anti-céramide) entraîne une diminution de la formation des rafts, une réduction de l'apoptose des cellules endothéliales et protège les souris du SGI (Zhang et al. 2007; Rotolo et al. 2012).

Malgré des recherches intensives sur la signalisation de l'ASMase, de nombreuses zones d'ombre subsistent encore quant aux mécanismes moléculaires participant à son activation (Corre et al. 2013). Parmi les mécanismes impliqués dans la régulation de l'apoptose endothéliale radio-induite, la contribution des ROS (Figure 21), a été révélée à la fois *in vitro* (Zhang et al. 2007), et *in vivo* chez le rat (Hatoum et al. 2006). La protéine p53 a également été incriminée. De manière intéressante, la comparaison du taux d'apoptose radio-induite dans deux modèles *vivo* déficients soit pour la protéine p53, soit pour l'ASMase, ont permis de démontrer une indépendance entre les céramides et p53 (Santana et al. 1996). Ces précédentes observations ont été confirmées par les travaux de Qiu *et al* qui ont montré que la délétion de PUMA, un effecteur de p53, n'affecte pas le taux d'apoptose endothéliale radio-induite chez la souris dans un modèle (TBI) de 15 et 18 Gy (Qiu et al. 2008). C'est en 2007 que Rotolo *et al* ont pu démontrer de manière élégante que l'apoptose des CE induite par l'ASMase passe de manière non redondante par les protéines pro-apoptotiques Bak et Bax. Dans ce modèle, la perte d'expression de ces deux protéines pro-apoptotiques (souris Bak<sup>-/-</sup> et souris Bax<sup>-/-</sup>) est associée avec une diminution de l'apoptose des CE intestinales (et non de l'épithélium) et confère une protection contre le syndrome gastro-intestinal après une irradiation forte dose corps entier de 15 Gy (Rotolo et al. 2008). Enfin, il s'avère que la voie SAPK-JNK (Stress-Activated Protein Kinase/cJun N-terminal Kinase), est également impliquée dans l'apoptose induite par les céramides (Verheij et al. 1996).

Bien que de nombreux travaux étayent ces précédents arguments, il existe encore à ce jour des discordances quant à la place de la dysfonction endothéliale dans l'évolution des dommages tissulaires radio-induits au cours du SGI. Quelques études tendent à remettre en cause l'existence de l'apoptose radio-induite des cellules endothéliales (Hendry et al. 2001; Suit et al. 2001). Certains auteurs ont utilisé une technique d'irradiation par Boron-thérapie (injection de liposomes contenant du bore <sup>10</sup>B suivie d'une irradiation corps entier avec différentes sources) permettant l'irradiation forte dose spécifique du compartiment microvasculaire (Schuller et al. 2006; Schuller et al. 2007). Bien que cette technique soit hautement ciblée, les résultats obtenus par cette équipe n'ont pas révélé de différence dans la

survie clonogénique des cellules souches intestinales chez les animaux irradiés (Schuller et al. 2006). En utilisant cette même méthodologie, ces auteurs n'ont pas pu mettre en évidence de CE apoptotiques dans la lamina propria chez des souris C57Bl/6 et BALBc exposées à des doses allant de 1 à 33 Gy. Ces auteurs suggèrent donc que l'apoptose endothéliale n'a pas d'influence sur l'évolution du SGI (Schuller et al. 2007). Une des raisons qui pourrait expliquer ces divergences de résultats serait une faible sensibilité de détection des CE apoptotiques (Gudkov et al. 2008). Plus récemment, les travaux de Kirsch *et al* ont tenté de départager qui de l'endothélium ou de l'épithélium est impliqué dans l'initiation du SGI. Pour se faire, ces auteurs ont d'abord comparé le nombre de cellules endothéliales/épithéliales apoptotiques dans des modèles de souris Bak<sup>-/-</sup>, Bax<sup>-/-</sup> et p53<sup>-/-</sup> après une irradiation corps entier de 16,95 Gy, dose pour laquelle le SGI est observé. Ces auteurs n'ont cependant pas observé de différence dans le développement du SGI chez les souris déficientes pour Bak et Bax aussi bien dans l'endothélium que dans l'épithélium, ce qui contredit les travaux de Rotolo *et al*. Une explication possible pour expliquer cette discordance concerne le syndrome hématopoïétique qui est aussi observé pour les doses utilisées pour induire le SGI. La seule façon de s'en affranchir est de réaliser une greffe de moelle osseuse. De plus, les résultats obtenus dans cette étude ont également pu montrer qu'une délétion épithéliale spécifique de p53 protège les animaux du SGI de manière apoptose-indépendante (Kirsch et al. 2010).

S'il est désormais admis que l'irradiation induit une importante vague de mort par apoptose de l'endothélium, il est également bien décrit que les CE survivantes sont capables de moduler leur phénotype et de s'activer en réponse à l'irradiation et d'influencer l'évolution de la pathogenèse radique.

#### **b. Activation radio-induite des cellules endothéliales**

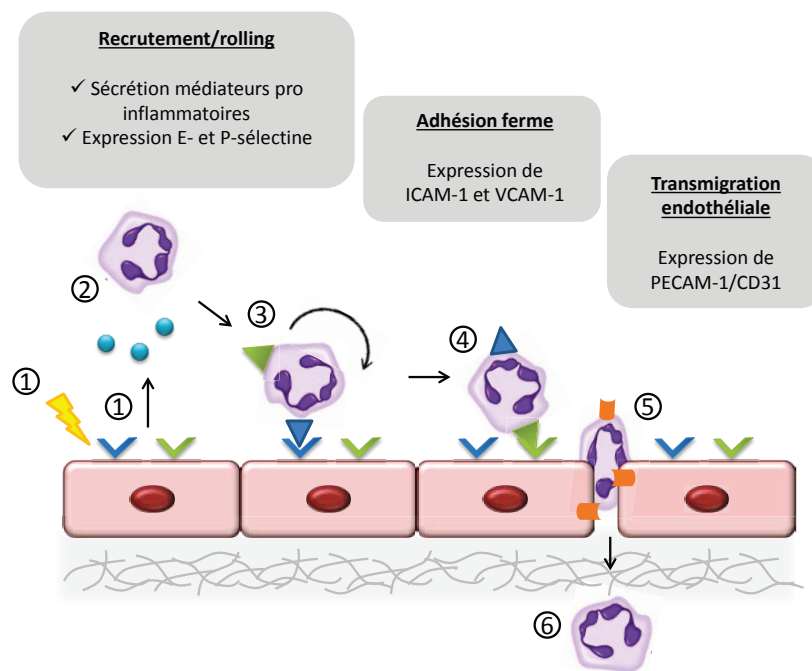
L'irradiation du réseau vasculaire est depuis de nombreuses années associée au développement de pathologies secondaires, notamment cardiovasculaires, avec une radiosensibilité particulièrement accrue du compartiment microvasculaire (Fajardo 2005). Les atteintes vasculaires sont fréquemment observées après irradiation et sont considérées comme la principale cause de morbidité à long terme chez les survivants du cancer traités par radiothérapie (Milliat et al. 2008a).

Les changements phénotypiques précoces de l'endothélium irradié sont aujourd'hui bien décrits et sont comparables à ceux observés dans un contexte de maladies inflammatoires du tube digestif (Binion et al. 1997). Il est notamment établi que dans les premières minutes qui suivent une irradiation, l'endothélium adopte un **phénotype pro-inflammatoire** de par la sécrétion de cytokines et de chimiokines (IL-1, IL-6, TGF- $\beta$ ), et via l'expression de molécules d'adhésion spécifiques à sa surface qui constituent un pré-requis nécessaire pour l'adhésion leucocyte-endothélium (**Figure 22**). On distingue ainsi 3 étapes majeures impliquées dans l'initiation de la réponse inflammatoire orchestrée par l'endothélium : le rolling, l'adhésion ferme puis la transmigration endothéliale (Quarmby et al. 1999a). De nombreuses études ont étayé par le passé l'implication de l'irradiation dans l'augmentation des molécules d'adhésion à la surface de l'endothélium telles que les intégrines, les cadhérines, les molécules de la superfamille des immunoglobulines (Ig), aussi bien *in vitro* dans différents types cellulaires, qu'*in vivo* au niveau du cerveau, des poumons, de l'intestin et de la peau (Baluna et al. 2006). Concernant la superfamille des Ig, il a été montré que l'irradiation induit une augmentation concomitante de l'expression d'ICAM-1 et l'adhésion des granulocytes neutrophiles à la surface des HUVECs de manière dose dépendante, dès 2 jours avec une persistance à 10 jours après une exposition de 10 Gy (Gaugler et al. 1997). *In vivo*, la neutralisation d'ICAM-1 par utilisation d'un anticorps spécifique (pour les temps précoces) et la déficience en ICAM-1 sont associées à la diminution du nombre de leucocytes recrutés, ainsi qu'à une diminution de la fibrose pulmonaire (Hallahan et al. 2002; Molla et al. 2003). Des résultats similaires ont été obtenus concernant la molécule PECAM-1/CD31, qui s'avère indispensable à l'interaction leucocyte-CE et à la migration transendothéliale des leucocytes après irradiation (Quarmby et al. 1999b; Gaugler et al. 2004). De même, une surexpression endothéliale de la P-sélectine a été observée dès 2 h après une exposition de 10 Gy dans un modèle d'irradiation abdominale chez la souris (Molla et al. 2001). Chez l'homme, l'expression des molécules VCAM-1 et la E-sélectine est augmentée 24h après irradiation (5 et 10 Gy) au sein de la microvasculature dans un modèle de culture d'explants de peau (Heckmann et al. 1998).

De façon générale, l'infiltration leucocytaire au sein du tissu irradié répond à une séquence d'événements définie qui est orchestrée par l'expression différée dans le temps de molécules d'adhésion exprimées à la fois à la surface de l'endothélium et à la surface des leucocytes. Ainsi, la distribution précoce (entre 2 et 4h après irradiation) des E- et P-sélectines (stockées dans les corps de Weibel-Palade) à la surface des CE intervient dans la phase de



rolling des leucocytes dès les premières minutes après la stimulation. Par la suite, l'expression d'ICAM-1 et de VCAM-1 favorise l'arrêt du roulement par l'adhésion ferme des leucocytes à l'endothélium via leurs interactions avec les intégrines leucocytaires (**Figure 22**). De manière intéressante, il a été montré dans un modèle d'irradiation abdominale de 10 Gy chez la souris qu'ICAM-1 est fortement exprimée 24h après irradiation, puis son expression retourne à un niveau basal 14 jours post-irradiation. En revanche, VCAM-1 est peu détectable en phase précoce mais possède un pic d'expression plus tardif 14 jours post-irradiation. Ceci suggère qu'ICAM-1 possède un rôle majeur dans le recrutement précoce des leucocytes et que VCAM-1 participe à la chronicité de ce recrutement (Molla et al. 2003). Enfin, ces mêmes auteurs ont montré que l'expression plus tardive de PECAM-1 est indispensable au processus d'émigration à travers les espaces intercellulaires des CE adjacentes (Molla et al. 2007). Ces différents événements cellulaires sont directement impliqués dans l'exacerbation de la réponse inflammatoire et contribuent au développement et au maintien des dommages aux tissus sains.



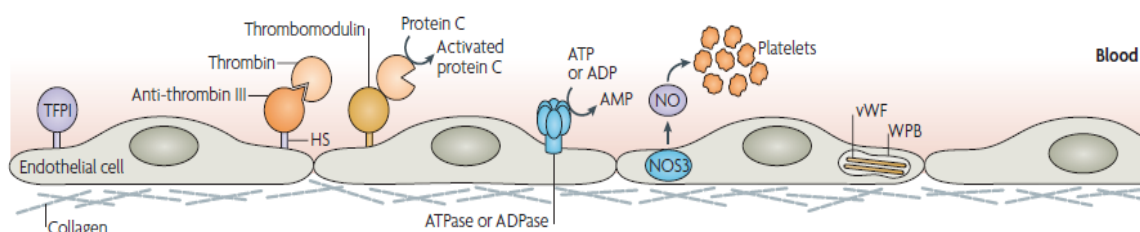
**Figure 22 :** Etapes du recrutement et de l'adhésion des leucocytes à la surface de l'endothélium.

Une autre conséquence de l'irradiation sur le phénotype endothélial concerne l'acquisition d'un **phénotype pro-adhésif et pro-thrombotique**. L'érosion progressive de la couche endothéliale favorise l'augmentation de l'adhésion des thrombocytes à la surface de

l'endothélium, étape initiale dans la formation du thrombus, pouvant conduire à une occlusion de la lumière vasculaire (thrombose). Le facteur von Willebrand (vWF) est une glycoprotéine intracytoplasmique stockée dans des vésicules particulières appelées les corps de Weibel-Palade (**Figure 23**). Ce facteur joue un rôle essentiel dans l'adhésion/agrégation plaquettaire en se fixant sur son récepteur GPIb, exprimé à la surface des thrombocytes. Cette liaison assure ainsi un pontage entre les constituants subendothéliaux et les plaquettes. *In vitro*, il a été montré qu'une exposition de 20 Gy induit une libération massive de vWF par les HUVECs 48h après l'exposition, ce qui est corrélée avec l'augmentation de l'adhésion des plaquettes ([Verheij et al. 1994](#)). Ces résultats ont été corroborés *in vivo*, via utilisation de techniques de microscopie intravitale dans un modèle d'irradiation abdominale chez la souris. Les résultats de cette étude ont confirmé qu'une irradiation de 10 Gy induit une augmentation du rolling, de l'adhésion des plaquettes ainsi que la formation de clusters (agrégats de thrombocytes) à la surface de l'endothélium des veinules post capillaires 24h post-irradiation ([Mouthon et al. 2003](#)). De la même manière, il a été montré que la surexpression de PECAM-1 par les CE microvasculaires pulmonaires (HMVECs-L) irradiées constitue un environnement propice à l'adhésion des thrombocytes et la formation de thrombi ([Gaugler et al. 2004](#)). L'acquisition du phénotype pro-thrombotique s'explique également par l'augmentation de l'activité enzymatique de la thrombine associée au dépôt de fibrine. La thrombine stimule l'activation de différents types cellulaires incluant les CMLVs, les plaquettes, les leucocytes et favorise le chimiotactisme et la prolifération des fibroblastes. ([Gu et al. 2004](#)). De plus, l'irradiation engendre des perturbations du système thrombomoduline-protéine C qui assure l'inhibition de la thrombine en conditions basales. Il a notamment été montré que l'irradiation engendre une réduction de la thromborésistance endothéliale via une perte d'expression de la thrombomoduline (TM) par les HUVECs de manière dose dépendante, avec un pic observé 24h post-irradiation pour des doses de 3, 12 et 50 Gy ([Zhou et al. 1992](#)). Des études cliniques et précliniques ont permis de mettre en évidence une réduction drastique de l'expression génique de la TM par les cellules microvasculaires intestinales associée à une immunoréactivité du TGF- $\beta$  dans des résections chirurgicales de patients atteints d'entéropathie radique ([Richter et al. 1997a](#); [Richter et al. 1998](#)). Enfin, plusieurs études menées au laboratoire se sont intéressées au rôle de l'inhibiteur des activateurs du plasminogène de type 1 (PAI-1), dans la toxicité aux tissus sains ([Milliat et al. 2008b](#); [Abderrahmani et al. 2009](#); [Abderrahmani et al. 2012](#); [Rannou et al. 2015](#)). Dans un contexte



physiologique, les activateurs du plasminogène, u-PA et t-PA, assurent la conversion du plasminogène en plasmine. Cette dernière est impliquée dans la dégradation de la fibrine insoluble. La surexpression de PAI-1 inhibe l'action d'u-PA et t-PA conduisant ainsi à la formation d'un dépôt de fibrine. Les résultats obtenus au cours de ces travaux ont permis de mettre en évidence que l'irradiation induit une modification du processus de fibrinolyse en faveur d'une surexpression de PAI-1 (Milliat et al. 2008b). De plus, l'utilisation de knock-out chez la souris (KO ubiquitaire PAI-1<sup>-/-</sup>, et KO endothélial spécifique PAI-1<sup>-/-</sup> KO<sup>endo</sup>) a pu mettre en évidence d'une part, l'implication de cette protéine dans les dommages radio-induits à l'intestin et d'autre part, que cet effet est initié par la dysfonction de l'endothélium (Abderrahmani et al. 2012; Rannou et al. 2015).



**Figure 23 : Représentation de la thromborésistance endothéliale (d'après Pober et al. 2007).**

Enfin, une augmentation de la **perméabilité vasculaire** est observée après irradiation de l'endothélium microvasculaire. Cette dernière est caractérisée par la fuite de protéines plasmatiques de type albumine dans l'espace interstitiel impliquée dans la formation d'œdème, principalement observée au niveau des veinules post-capillaires (Krishnan et al. 1988). Chez le rat, une irradiation abdominale de 20 Gy induit une augmentation de la perméabilité vasculaire 6h post-irradiation associée avec la transmigration des GN à travers l'endothélium (Panes et al. 1995). De même, une augmentation du **tonus vasculaire** a été observée 3 jours après irradiation avec une diminution du diamètre des vaisseaux associée à une réduction du flux sanguin et de la vitesse des érythrocytes (Roth et al. 1999).

Enfin, l'irradiation va également impacter le processus d'**angiogenèse**. Pour des faibles doses, utilisées par exemple lors de traitements fractionnés, une augmentation du processus d'angiogenèse consécutif à l'irradiation a été observée aussi bien dans la tumeur que dans les tissus sains. Ceci s'explique entre autres par une augmentation de l'expression de

facteurs de croissance comme le VEGF, acteur essentiel dans l'angiogenèse et la vasculogenèse (Milliat et al. 2008a). Une corrélation entre l'augmentation de l'expression du VEGF, la densité capillaire et le développement de la fibrose cardiaque a notamment été mise en évidence dans un modèle de diabète chez la souris (Widyantoro et al. 2010). Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'angiogenèse radio-induite sont actuellement peu connus mais la présence des cytokines pro-inflammatoires semble jouer un rôle central dans l'initiation de ce processus. L'augmentation de l'angiogenèse est par ailleurs retrouvée dans la maladie de Crohn et pourrait être délétère dans le contexte de l'irradiation car elle participe à l'exacerbation de la réponse inflammatoire via le recrutement des leucocytes (D'Alessio et al. 2013).

#### 4. Dysfonction endothéliale et dommages radio-induits : quels liens ?

Dès 1968, Rubin et Casarett relataient l'existence d'un lien entre les dommages vasculaires radio-induits observés en phase aiguë et les lésions chroniques (Rubin et al. 1968). C'est en 2001 que les travaux de l'équipe de R. Kolesnik ont confirmé de façon formelle la place de la dysfonction endothéliale dans l'initiation et la progression des dommages radio-induits aux tissus sains. Leurs travaux novateurs ont notamment bouleversé le concept de la « cellule cible » qui jusqu'à cette période, identifiait la cellule souche épithéliale comme étant la cible privilégiée des rayonnements ionisants, responsable du développement du SGI (Paris et al. 2001). Cette notion a été abordée précédemment p75 dans la partie « Apoptose radio-induite des CE » et est soutenue par un certain nombre d'études mettant en avant le rôle de l'apoptose endothéliale dans différents tissus.

Toujours concernant les effets des fortes doses sur le tube digestif, les travaux de Cho et al ont montré que l'administration d'un variant de l'angiopoïétine-1 (COMP-Ang1) est associée à une diminution de l'apoptose des CE intestinales exprimant Tie2, 4h après des expositions corps entier à 12 et 15 Gy, avec une réduction de la mortalité des animaux (Cho et al. 2004). L'équipe d'A. Gudkov a utilisé une stratégie originale qui a consisté à mimer un mécanisme cellulaire anti-apoptotique utilisé par les cellules tumorales. Dans ce modèle, une injection préventive de CBLB502, un polypeptide dérivé de la flagelline qui se fixe au TLR5, favorise l'activation de la voie NF- $\kappa$ B qui a par le passé été montrée comme bénéfique dans

l'atténuation du SGI (Wang et al. 2004). De manière surprenante, leurs travaux ont montré que l'injection préventive (1h avant l'irradiation) de CBLB502 est associée avec une diminution de l'apoptose endothéliale dans un modèle TBI de 15 Gy chez la souris. De plus, les animaux présentent une augmentation du nombre de cryptes proliférantes ainsi qu'une meilleure survie. Les auteurs ont pu confirmer que cet effet radioprotecteur passe par l'induction de gènes cibles de la voie NF- $\kappa$ B tels que SOD2 qui est surexprimé dans la lamina propria des souris traitées (Burdelya et al. 2008).

Enfin, des travaux plus récents effectués au laboratoire ont permis de confirmer le rôle de l'endothélium vasculaire dans l'initiation et la progression des dommages radio-induits aux tissus sains. Dans cette étude, la délétion endothéliale spécifique de PAI-1 est associée à une réduction de l'apoptose endothéliale et des dommages radio-induits dans un modèle d'entérite radique chez la souris (irradiation localisée du grêle) (Abderrahmani et al. 2012). Après examen histologique, il a été montré que les souris PAI-1 KO<sup>endo</sup> présentent des dommages moins sévères 3 jours après une irradiation localisée de l'intestin grêle à 19 Gy, avec une meilleure régénération des cryptes et de la muqueuse 7 jours après l'exposition. De plus, la délétion de PAI-1 dans ce modèle induit une réduction de l'infiltrat macrophagique et une modulation de la polarisation des phénotypes M1/M2 au profit du phénotype M2, anti-inflammatoire (Rannou et al. 2015).

Les cellules endothéliales participent activement au maintien de l'homéostasie vasculaire ainsi qu'à la régulation d'une multitude de fonctions biologiques. Il existe un consensus dans la communauté scientifique qui s'accorde à attribuer un rôle majeur à l'endothélium dans l'initiation et la progression de l'entérite/rectite radique. Néanmoins, les mécanismes reliant l'endothélium à l'apparition et au maintien des lésions radio-induites et donc l'implication de ce type cellulaire dans l'évolution des dommages restent encore à être élucidés. C'est précisément dans cette thématique de recherche que s'inscrit ce travail de thèse qui tend à améliorer les connaissances sur ce compartiment et plus précisément, au regard des mécanismes physiologiques et physiopathologiques régulant l'activation endothéliale dans le développement des pathologies digestives radio-induites.

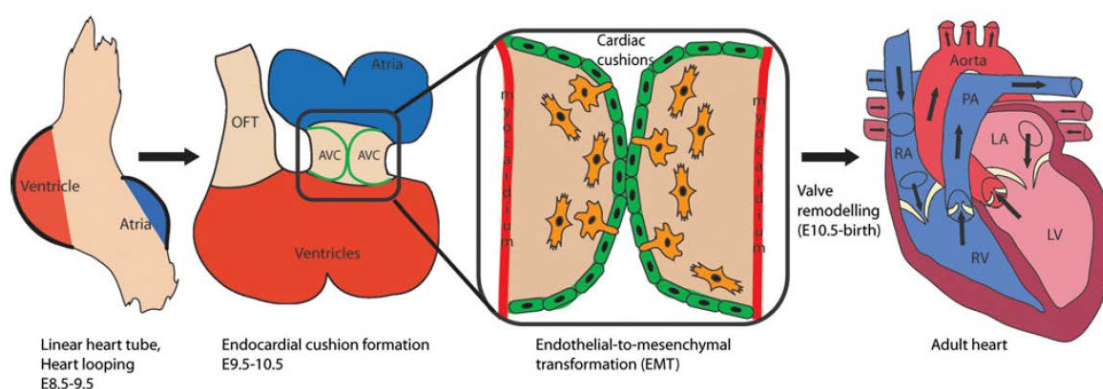
## Chapitre 5. La transition endothélium-mésenchyme

Comme nous venons de le voir au cours du chapitre précédent, l'activation des CE constitue une étape majeure dans l'évolution des dommages radio-induits aux tissus sains et probablement dans l'évolution de la fibrose radique. L'endothélium possède une plasticité particulière qui lui permet de réguler une pléthore de fonctions biologiques. Cette plasticité endothéliale a par ailleurs été mise en évidence lors d'un phénomène surprenant au cours duquel la CE est capable de moduler son phénotype en réponse à certains stimuli, et de se transdifférencier en cellule mésenchymateuse. Ce phénomène fait référence à la **transition-endothélium-mésenchyme** ou **EndoMT**. Ces dernières années, l'EndoMT a été impliquée dans divers contextes pathologiques et principalement associée au développement de fibroses d'étiologies variables au sein de différents organes. Toutefois, les connaissances permettant de relier ce phénomène aux pathologies radio-induites restent à ce jour limitées. C'est dans ce contexte que s'inscrit ce travail de thèse qui tend à déterminer la part de l'EndoMT dans l'évolution de la fibrose digestive radio-induite et à améliorer les connaissances sur les mécanismes moléculaires et cellulaires gouvernant ce processus.

### 1. EndoMT en physiologie : formation des valves cardiaques

La transition endothélium-mésenchyme a initialement été mise en évidence au cours de la formation des valves cardiaques durant l'embryogenèse (valvulogenèse) chez les vertébrés. Le cœur est le premier organe à se développer et à fonctionner au sein de l'embryon. Sa formation débute par une structure tubulaire composée de deux couches cellulaires : l'endocarde identifié comme la couche interne du cœur, et le myocarde qui constitue la paroi externe ([Paranya et al. 2001](#)). C'est en 1975 que l'EndoMT a été observée pour la première fois par Markwald *et al* au cours d'une analyse détaillée de la cytodifférenciation endocardique par microscopie électronique à transmission (TEM) ([Markwald et al. 1975](#)). Ces auteurs ont suivi le développement cardiaque d'embryons de rats et ont observé qu'à 9,5 jours embryonnaires une partie des cellules endocardiques situées dans le canal atrio-ventriculaire (AVC) et au niveau la voie efférente (où outflow tract, OTF), sont sujettes à des altérations phénotypiques et morphologiques particulières (**Figure 24**). Parmi ces modifications, une hypertrophie cellulaire, une latéralisation de l'appareil de Golgi, la

formation d'appendices cellulaires et la perte de polarité cellulaire ont été remarquées (Markwald et al. 1975). Ces précédentes observations ont par la suite été confirmées dans un modèle d'embryon de poulet. Les résultats obtenus ont pu confirmer *in vivo* et *in vitro* le changement phénotypique d'une certaine population de CE cardiaques activées qui acquièrent un phénotype migratoire associé avec l'expression concomitante de l' $\alpha$ -SMA (Nakajima et al. 1997). Il est aujourd'hui admis qu'en réponse à des signaux spécifiques (TGF- $\beta$ 2) restreints au niveau de l'AVC, les cellules endocardiques activent des mécanismes permettant une réorganisation de leur cytosquelette et perdent de façon simultanée l'expression de molécules d'adhésion telle que la VE-cadhérine (vascular endothelial cadherin), qui entraîne un désassemblage des CE et conduit à une rupture de la morphogenèse vasculaire (Crosby et al. 2005). Enfin, l'acquisition du phénotype migratoire par ces cellules en transition permet d'envahir un espace paucicellulaire particulier situé entre l'endocarde et le myocarde au niveau de l'AVC, appelé la **gelée cardiaque** (matrice riche en collagène et en acide hyaluronique) (Garside et al. 2013). Les cellules en EndoMT présentes au sein de la gelée cardiaque sont à ce stade appelées cellules valvulaires interstitielles, qui une fois différenciées en myofibroblastes, assurent la synthèse de MEC et la formation du septum et des coussins endocardiques (Person et al. 2005). Ces derniers formeront, après plusieurs remodelages, les valves cardiaques semilunaires et atrio-ventriculaires matures (Markwald et al. 1975; Goumans et al. 2008; Yu et al. 2014)



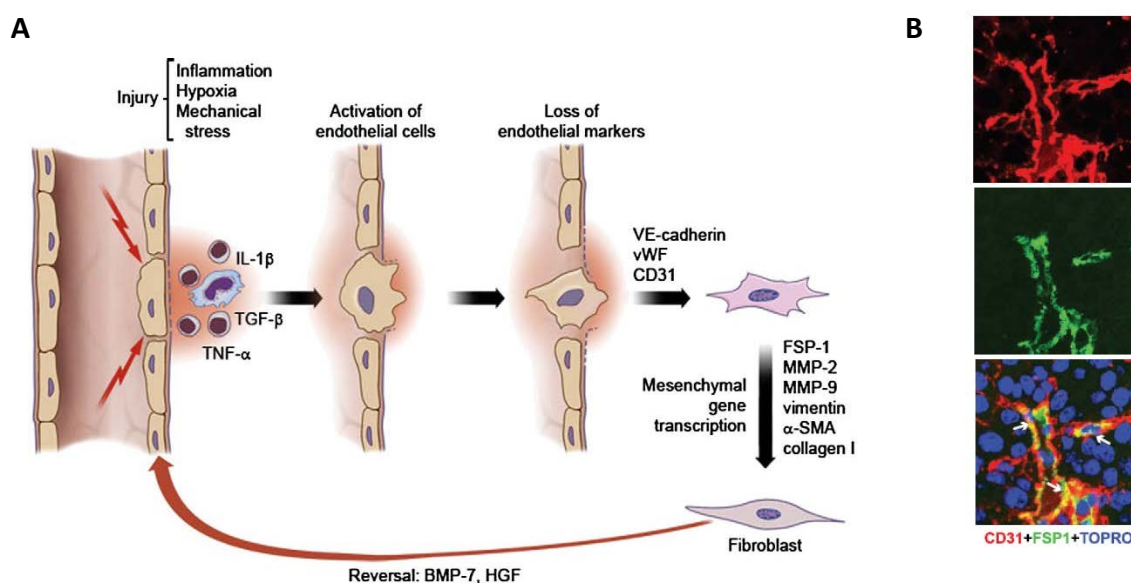
**Figure 24 :** Rôle de l'EndoMT au cours du développement embryonnaire : formation du septum et des valves cardiaques (d'après Garside et al. 2013). OFT : OutFlow Tract (voie éfférente) ; AVC : Canal atrio-ventriculaire ; RV : ventricule droit ; LV : ventricule gauche ; RA : oreillette droite ; LA : oreillette gauche ; PA : artère pulmonaire.

Les changements phénotypiques et fonctionnels des CE en transition s'expliquent avant tout par des modulations importantes de leur profil d'expression génique et protéique. En effet, au cours de l'EndoMT une perte de l'expression de marqueurs caractéristiques des CE est observée avec l'acquisition concomitante de celle de marqueurs mésenchymateux (**Figure 25**). Parmi les principaux marqueurs suivis dans la littérature, le facteur von Willebrand, le CD31 et la VE-cadhérine sont les protéines endothéliales les plus étudiées et réprimées au cours de ce processus (**Tableau 4**). Concernant les marqueurs mésenchymateux, l' $\alpha$ -SMA, la smooth muscle 22 $\alpha$  (SM22 $\alpha$ ), la vimentine ou encore la N-cadhérine sont les acteurs majoritairement suivis au cours de l'EndoMT ([Goumans et al. 2008](#)). L'ensemble de ces altérations protéiques entraînent des perturbations fonctionnelles, notamment la perte de la polarité apico-basale et de l'intégrité de la barrière endothéliale, et l'augmentation de la perméabilité vasculaire ([Good et al. 2015](#)). De plus, l'expression des protéines mésenchymateuses est associée avec l'acquisition d'un **phénotype migratoire/invasif, pro-inflammatoire** (IL-4, IL-13, IL-6, IL-8 et TNF- $\alpha$ ), et **sécrétoire** avec la synthèse de fibronectine et de collagènes ([Good et al. 2015](#)). Ainsi, les cellules en EndoMT participent directement au maintien du statut pro-inflammatoire, à l'activation des cellules avoisinantes et à l'augmentation du pool de cellules myofibroblastiques responsables du remodelage matriciel observé à la fois dans la valvulogénèse mais également dans un contexte fibrotique.

Les études menées *in vitro* ont permis une meilleure compréhension des altérations phénotypiques des CE au cours de l'EndoMT. Néanmoins, il est important de souligner que la signature protéique observée pendant la transition n'est pas strictement définie et identique dans tous les contextes. En effet, l'EndoMT apparaît comme une « **évolution globale** » du programme protéique vers l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux, dont la nature des marqueurs réprimés et surexprimés est fonction de facteurs multiples (exogènes et endogènes) encore mal connus aujourd'hui. En d'autres termes, la spécificité de la signature protéique d'une cellule en EndoMT va dépendre de la nature du stress (agent inducteur), de l'origine tissulaire des CE et de la composition de l'environnement cytokinique dans lequel se trouvent ces dernières. Comme nous le verrons un peu plus loin dans ce chapitre, l'hétérogénéité phénotypique des cellules en EndoMT peut également s'expliquer par l'implication de différentes voies de signalisation cellulaire. En effet, leur activation simultanée ou différée serait un facteur déterminant dans l'orientation de la transdifférenciation soit vers un phénotype fibroblastique, myofibroblastique ou musculaire lisse (CML). Ainsi, l'EndoMT



apparaît comme un processus finement régulé et orchestré selon trois étapes : (i) la perte d'expression des protéines endothéliales, (ii) l'activation du programme mésenchymateux/fibrogénique et finalement, (iii) l'activation du programme myogénique (Krizbai et al. 2015).



**Figure 25 :** Illustration de l'EndoMT : (A) Processus d'EndoMT induit par les cytokines pro-inflammatoires et réversion par le BMP-7 et le HGF (d'après Rieder et al. 2008). (B) Mise en évidence de l'EndoMT *in vivo* chez la souris par co-marquage en immunofluorescence CD31 (rouge) ; FSP1 (vert) ; (d'après Zeisberg et al. 2007a).

L'EndoMT est fréquemment décrite dans la littérature comme étant une forme de transition épithélium-mésenchyme ou EMT (Saito 2013). Cette transition est caractérisée par la perte de polarisation cellulaire concernant cette fois-ci les cellules épithéliales, dont l'évolution conduit vers un switch phénotypique de type mésenchymateux (Kalluri et al. 2009). L'EMT constitue la base d'étude de l'EndoMT due à une importante analogie dans la séquence des événements initiateurs et régulateurs impliqués dans ces deux phénomènes (Annexe 4) (Arciniegas et al. 2007; Kovacic et al. 2012). En effet, tout comme pour l'EMT, l'IL-1 $\beta$ , l'IL-6 et le TNF- $\alpha$  favorisent son induction, mais le TGF- $\beta$  reste certainement le principal agent activateur des deux phénomènes. De manière intéressante, une forme de transition opposée à l'EMT a été mise en évidence, la transition mésenchyme-épithéliale (MET), qui participe à la formation des trois couches germinales (ectoderme, mésoderme et

endoderme), après une succession de vagues EMT/MET. Concernant, l'EndoMT, l'existence d'une forme de transition opposée n'a pas été identifiée de façon formelle en conditions physiologiques. Seuls les travaux d'Ubil *et al* ont pu montrer qu'une population de fibroblastes cardiaques pouvait exprimer certains marqueurs endothéliaux (VE-cadhérine, eNOS, claudine-5) dans un modèle d'ischémie cardiaque chez la souris (Ubil *et al.* 2014). Ces auteurs ont pu mettre en évidence que cette transition mésenchymo-endothéliale (MEndoT) passe par une activation de p53 dès 3 jours après l'induction de l'ischémie vasculaire. L'EndoMT physiologique a essentiellement été observée au stade embryonnaire chez l'homme au niveau des valves cardiaques semilunaires, avec une fréquence estimée à environ 5 à 10% de cellules exprimant à la fois le CD31 et l' $\alpha$ -SMA contre 1% chez l'adulte (Paruchuri *et al.* 2006). Enfin, la participation de l'EndoMT au cours de l'embryogenèse a également été mise en évidence dans la formation des veines intrapulmonaires (Hall *et al.* 2002; Paruchuri *et al.* 2006).

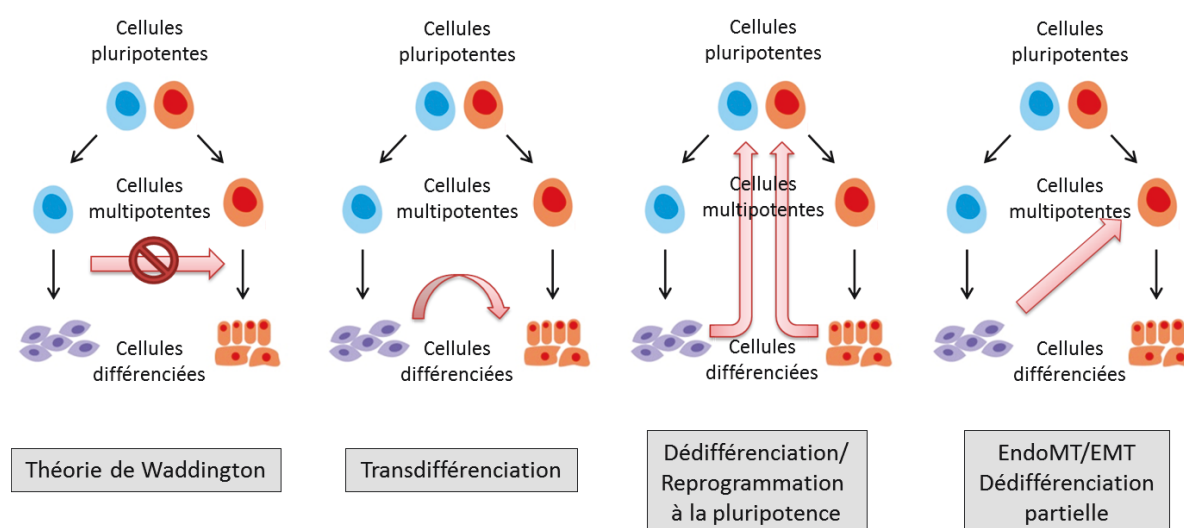
Marqueurs endothéliaux	Marqueurs mésenchymateux
CD31/PECAM1	$\alpha$ -SMA
vWF	FSP1 (Fibroblast Specific Protein 1)
VE-cadhérine	SM22 $\alpha$ (Smooth Muscle 22 $\alpha$ )
Tie1	N-cadhérine
Tie2	Vimentine
Endogline/CD105	Nestine
CD34	CD73
NO synthase (eNOS)	Collagènes I et III
CD146	PDGFR $\beta$
VEGFR2	MMP-2 et 9
Claudine-5	Calponine
	CD90
	F-actine
	SM-MHC (VSMC-specific Myosin Heavy Chain)
	Smootheline
	Twist1
	$\beta$ 1-intégrine
	Fibronectine

**Tableau 4** : Principaux marqueurs de l'EndoMT suivis dans la littérature.



La notion de **différenciation cellulaire** a pendant longtemps été considérée comme « une voie à sens unique » au début de laquelle une cellule souche pluripotente immature s'engageait puis évoluait vers un phénotype différencié, sans possibilité de « retour en arrière ». Le stade final correspond à la différenciation d'un type cellulaire donné avec des propriétés biologiques qui lui sont caractéristiques. Ce concept a été imaginé en 1957 et fait référence au « paysage épigénétique de Waddington » ([Takahashi 2012](#)). Or, nous savons depuis peu que le processus de différenciation cellulaire n'est pas aussi strict et figé et qu'il existe une certaine flexibilité/plasticité cellulaire permettant le changement artificiel du devenir cellulaire défini par le terme de **reprogrammation cellulaire**. Ce phénomène dépend essentiellement de la modulation de l'expression de gènes spécifiques permettant la réjuvenation des cellules différenciées vers un phénotype pluripotent, on parle de **dédifférenciation**, **Figure 26** ([Coll-Bonfill et al. 2015](#)).

L'EndoMT et l'EMT sont deux exemples remarquables de cette plasticité cellulaire somatique qui opère naturellement au travers de l'organogenèse. Les travaux de Medici *et al* ont été novateurs dans ce domaine et ont révélé que les cellules engagées dans un processus d'EndoMT sont capables d'acquérir des propriétés de cellules souches, remettant ainsi en cause la théorie de Waddington. De manière intéressante, ces travaux ont montré que l'expression constitutive d'ALK2 (T $\beta$ RI), induit l'EndoMT chez les HUVECs et les HCMEC (Human Cutaneous Microvascular Endothelial Cell) associée avec l'acquisition d'un phénotype multipotent de CSM ([Medici et al. 2010](#)). Par ailleurs, l'EndoMT est décrite par d'autres équipes comme étant une forme de **transdifférenciation** (**Figure 26**). Ce terme fait référence à un changement phénotypique d'un type cellulaire différencié vers un phénotype mature possédant d'autres fonctions biologiques, ceci sans passer par un état pluripotent intermédiaire ou par un stade de progéniteur ([Takahashi 2012](#)). Enfin, l'EndoMT pourrait être une étape initiale du processus de dédifférenciation ou de reprogrammation à travers laquelle les cellules acquièrent un phénotype immature sans pour autant se convertir en cellules pluripotentes, **Figure 26** ([Coll-Bonfill et al. 2015](#)). Ces nouvelles découvertes ont permis d'actualiser le concept de Waddington quant aux possibilités de modulation du phénotype d'un type cellulaire donné. Toutefois, d'autres études devront être menées afin de préciser le phénotype souche des cellules en EndoMT. Compte tenu de la limite des connaissances quant au profil de différenciation des cellules en EndoMT et dans un souci de clarté, le terme de **transition** sera utilisé dans la suite de ce chapitre afin d'évoquer ce phénomène.



**Figure 26 :** Présentation des différentes formes de différenciation cellulaire (adapté de Coll-Bonfill *et al.* 2015). Présentation de la théorie de Waddington et des notions de transdifférenciation, de dédifférenciation ou reprogrammation et de dédifférenciation partielle.

Bien que l'EndoMT ait été considérée par le passé comme un phénomène rare et restreint au développement embryonnaire, il est par la suite apparu évident que de ce processus avait également lieu dans le compartiment vasculaire chez l'adulte. En 1992, les travaux d'Arciniegas *et al* sont les premiers à caractériser l'EndoMT *in vitro* à partir de CE aortiques bovines (BAECs). Les résultats obtenus dans cette étude ont permis de montrer que la présence de TGF- $\beta$ 1 dans le milieu de culture des BAECs pendant 5 jours est associée avec une augmentation du marqueur mésenchymateux,  $\alpha$ -SMA, de 40 à 60% en comparaison avec des cellules témoin. Des marquages en immunofluorescence ont pu confirmer que certaines cellules exprimaient à la fois l' $\alpha$ -SMA et le marqueur endothélial vWF, illustrant ainsi le phénomène d'EndoMT. Ces mêmes auteurs ont également observé que les cellules fortement marquées pour l' $\alpha$ -SMA exprimaient peu le vWF et inversement, les cellules positives pour le vWF exprimaient peu l' $\alpha$ -SMA (Arciniegas *et al.* 1992). Des résultats similaires ont été obtenus dans un autre modèle de culture *in vitro*. Dans ce modèle, l'absence de collagène dénaturé sur le support de culture des BAECs est associée avec l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux de type cellule musculaire, via l'expression de SM22 $\alpha$  et de calponine (Frid *et al.* 2002). L'ensemble de ces travaux confirment donc la capacité des CE adultes à pouvoir se différencier en cellules mésenchymateuses *in vitro*.

## 2. Caractérisation fonctionnelle des cellules au cours de l'EndoMT

Les notions de **stabilité** et de **réversibilité** du phénotype mésenchymateux obtenu après EndoMT ont par la suite été étudiées en analysant l'évolution de la signature protéique après plusieurs jours de culture en présence de différentes cytokines pro-inflammatoires (TGF- $\beta$ 1, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ). Les résultats obtenus *in vitro* ont montré que l'EndoMT est initiée dès les premières heures (6h) après la stimulation et que ce processus pouvait être réversible pour des durées de culture inférieures à 10 jours en présence de cytokines pro-inflammatoires. En revanche, lorsque les cellules sont exposées aux cytokines pour une période de 20 jours, l'acquisition du phénotype mésenchymateux s'avère stable au cours du temps et irréversible (Arciniegas et al. 1992; Chaudhuri et al. 2007; Rieder et al. 2011). De la même manière, il a été montré que la culture de CE vasculaires pulmonaires humaines (HPVECs) en présence de TGF- $\beta$ 2 favorise l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux, et que l'ajout de VEGF dans le milieu de culture permet de conserver et de restaurer le phénotype endothélial après 10 jours de culture (Paruchuri et al. 2006). Ceci suggère que le VEGF joue un rôle clef dans le maintien du phénotype endothélial. En termes de **fonctionnalité cellulaire**, ces mêmes auteurs ont mis en évidence que les cellules en transition perdent leur capacité à former des tubes en Matrigel®, caractéristique des CE fonctionnelles. Une autre caractéristique principale des CE concerne leur capacité à exprimer des molécules d'adhésion (ICAM-1, VCAM-1, E-sélectine), en réponse à une stimulation au TNF- $\alpha$ . Les résultats obtenus dans cette étude ont révélé que le traitement par le TGF- $\beta$ 2 abroge l'expression des molécules d'adhésion et l'adhésion ferme des leucocytes aux CE. Enfin, un prétraitement par le VEGF permet de restaurer de manière modeste cette adhésion et donc de reverser ce phénotype pour des temps précoces (Paruchuri et al. 2006).

Concernant la mobilité cellulaire, il a été montré qu'après stimulation des CE en transition par un chimioattractant des myofibroblastes, le PDGF-BB, ces dernières acquièrent un **phénotype migratoire** associé à l'EndoMT (Paranya et al. 2001). De plus, l'analyse de la prolifération cellulaire a révélé que les cellules en EndoMT sont capables de progresser à travers le cycle cellulaire et que l'inhibition de ce dernier par ajout de mitomycine C dans le milieu de culture n'influe pas sur l'expression de l' $\alpha$ -SMA. Ceci démontre que l'expression de l' $\alpha$ -SMA est indépendante de la prolifération cellulaire (Paranya et al. 2001). Enfin, la nature de la matrice extracellulaire apparaît également comme un paramètre déterminant dans

l'induction de l'EndoMT. Au cours de la valvulogénèse, l'acide hyaluronique (AH) présent en grande quantité au sein de la gelée cardiaque permet par exemple la stimulation de l'EndoMT via sa fixation et l'activation de récepteurs membranaires (CD44) des CE (Lagendijk et al. 2013). Une augmentation du dépôt tissulaire d'AH est par ailleurs observée dans plusieurs pathologies inflammatoires et pourrait favoriser l'activation excessive de l'EndoMT et le développement de fibroses (Albeiroti et al. 2015). *In vitro*, l'influence de la MEC a été démontrée via la culture de CE en présence de fibronectine, de gélatine ou de collagène. Les résultats obtenus ont révélé que la fibronectine induit une augmentation de l'expression de l' $\alpha$ -SMA par les CE plus élevée en comparaison avec une matrice de gélatine et de collagène. Ainsi, la nature matricielle du microenvironnement influence l'induction de l'EndoMT physiologique et pourrait jouer un rôle dans le développement de la fibrose (Paruchuri et al. 2006). L'ensemble de ces travaux a donc permis une meilleure caractérisation fonctionnelle des cellules en EndoMT et a révélé l'acquisition d'un phénotype évolutif. Tout d'abord, une phase de transdifférenciation **précoce et réversible** est observée dès les premières heures après la mise en culture des CE. Par la suite, les CE acquièrent l'expression de protéines mésenchymateuses associée à une diminution de l'expression du vWF, une morphologie allongée et un profil migratoire (Chaudhuri et al. 2007). Dans un second temps, la présence chronique de cytokines pro-inflammatoires ou la présence d'un environnement défavorable à l'adhésion cellulaire, favorise l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux-like **irréversible et stable** dans le temps (Frid et al. 2002; Chaudhuri et al. 2007).

En ce qui concerne la nature du phénotype mésenchymateux obtenu après EndoMT induite par le TGF- $\beta$ 1, certains travaux ont pu montrer que les cellules en transition expriment des marqueurs similaires à ceux caractérisant les cellules mésenchymateuses primaires à savoir, l' $\alpha$ -SMA, le PDGF- $\beta$ , la SM22 $\alpha$  ou encore la protéine LOX (lysyl oxydase, impliquée dans la maturation de la MEC) (Cooley et al. 2014). Enfin, les CE possèdent avec les macrophages, une capacité à incorporer et à métaboliser les LDL acétylés via la voie « scavenger cell pathway » favorisant le renouvellement du cholestérol membranaire (Voyta et al. 1984). La mesure de l'intensité de la fluorescence des LDL acétylés marqués par un fluorochrome (Dil-Ac-LDL) constitue une technique couramment utilisée afin de vérifier la pureté des CE en culture. Les travaux de Ghosh *et al* ont permis de montrer qu'après 7 jours de culture en présence de TGF- $\beta$ 2, les cellules endothéliales cardiaques de souris présentent une incapacité à incorporer les LDL acétylés. Ces travaux mettent donc en évidence la perte

des caractéristiques endothéliales associée à l'acquisition simultanée d'un phénotype mésenchymateux-like (Ghosh et al. 2012).

En résumé, le processus d'EndoMT apparaît comme le reflet d'une altération permanente du profil endothélial vers l'acquisition d'un **phénotype mésenchymateux-like** dont la spécificité de la signature protéique repose sur la nature des agents inducteurs présents dans le microenvironnement ainsi que sur l'origine tissulaire des CE. La réversion de ce phénomène semble possible pour des temps précoces après son initiation, mais l'acquisition du phénotype mésenchymateux apparaît stable dans un contexte d'induction chronique. D'autres études sont néanmoins nécessaires afin de mieux caractériser le phénotype mésenchymateux obtenu après la transition, ainsi que pour déterminer de manière plus précise le lien entre la nature des signaux exogènes et l'acquisition d'une signature protéique spécifique.

### **3. EndoMT : du développement cardiovasculaire aux processus pathologiques**

L'hypothèse selon laquelle l'EndoMT participerait au développement de la fibrose a été soulevée en 1989 par Beranek *et al*, faisant suite à l'observation de fibroblastes exprimant le marqueur endothélial vWF dans le tissu de granulation formé dans un contexte d'ulcère veineux de la jambe (Beranek 1989). Elle a depuis été confirmée par un certain nombre de travaux qui ont montré la participation active de l'EndoMT dans le développement de diverses pathologies dont les fibroses, au cours de la formation de fibroblastes associés au cancer (CAF), dans l'athérosclérose, la sclérodermie systémique ou encore dans la formation osseuse ectopique (Yu et al. 2014). L'évolution majeure des techniques de transgénèse chez la souris est à la base de la caractérisation de l'EndoMT *in vivo*. Il est en effet possible, par ces approches, de suivre le devenir de cellules ayant une origine endothéliale via l'expression d'un gène rapporteur tel que la GFP (Green Fluorescent Protein) ou la  $\beta$ -galactosidase (via l'expression du gène LacZ), sous le contrôle d'un promoteur spécifique des cellules endothéliales comme Tie1 (Tyrosine kinase with immunoglobulin and EGF homology domains 1), Tie2 ou la VE-cadhérine. Ainsi, un co-marquage en immunohistochimie du traceur endothélial spécifique avec un marqueur mésenchymateux permet d'identifier les cellules en transition qui sont caractérisées par l'expression simultanée des deux marqueurs.

#### a. Implication de l'EndoMT dans les pathologies fibrotiques

Après analyse des connaissances actuelles sur l'EndoMT, il semble évident que la fibrose est le principal contexte pathologique dans lequel ce phénomène ait été identifié (Piera-Velazquez et al. 2011). En 2007, Zeisberg *et al* ont étudié le rôle de l'EndoMT dans le développement de la **fibrose cardiaque** via l'utilisation d'un modèle de souris transgéniques dans lesquelles les cellules endothéliales sont marquées par la  $\beta$ -galactosidase (souris Tie1-LacZ). Leurs résultats ont permis de montrer que 27 à 35% des fibroblastes (FSP1<sup>+</sup> et  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>) possèdent une origine endothéliale dans ce modèle (Zeisberg et al. 2007b). De plus, l'administration systémique de rhBMP-7 aux animaux permet de réduire de 80% et de 66% le nombre de fibroblastes  $\beta$ -gal/ $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> et  $\beta$ -gal/FSP1<sup>+</sup>, et favorise la réduction de la fibrose. D'autres travaux viennent étayer ces précédents résultats et confirment le rôle de l'EndoMT dans le développement de la fibrose cardiaque dans un modèle de diabète mellitus induit par injection de streptozotocine chez la souris (Widyantoro et al. 2010).

De même, la participation de l'EndoMT a été observée dans un modèle de **fibrose pulmonaire** induite par la bléomycine chez la souris. Toujours en utilisant un modèle de souris double transgénique dans lequel le gène LacZ est cette fois-ci exprimé sous le contrôle du promoteur endothélial Tie2, ces auteurs ont pu montrer par immunomarquage que 16% des fibroblastes sont positifs à la  $\beta$ -galactosidase et possèdent donc une origine endothéliale (Hashimoto et al. 2010). De manière intéressante, ces auteurs ont pu caractériser deux sous-populations de fibroblastes issues de l'EndoMT : une population exprimant à la fois  $\alpha$ -SMA et le collagène I représentée à 15% ; et une population  $\alpha$ -SMA négative et collagène I positive représentée à 85%. Cette étude souligne donc l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux hétérogène correspondant dans ce cas à une forme myofibroblastique et une forme de CML.

En 2008, Zeisberg *et al* ont mis en évidence pour la première fois la participation de l'EndoMT dans le développement de la **fibrose rénale** dans trois modèles de néphropathies chez la souris : un modèle de néphropathie obstructive, un modèle de néphropathie diabétique induite par la streptozotocine et un modèle de souris déficientes pour la chaîne  $\alpha$ 3 du collagène IV (modèle de la maladie d'Alport). Les résultats obtenus ont permis de montrer que 30 à 50% des fibroblastes co-expriment le marqueur endothélial CD31 et les marqueurs mésenchymateux  $\alpha$ -SMA et FSP-1 (Zeisberg et al. 2008). Ces résultats ont été corroborés par d'autres travaux qui ont confirmé le rôle précoce de l'EndoMT dans le développement de la

fibrose dans un modèle de néphropathie diabétique chez la souris (Tie2-EGFP). Ces auteurs ont pu identifier la présence d'une population double positive pour l' $\alpha$ -SMA et l'EGFP au niveau des artérioles glomérulaires afférentes/efférentes, un mois après induction du diabète chez les animaux (Li et al. 2009). Ces résultats confirment la place de l'EndoMT dans l'initiation de la fibrose rénale mais suggèrent également que ce processus participe à la glomérulosclérose (Zhou et al. 2014b).

Le rôle potentiel de l'EndoMT dans le développement de la **fibrose cutanée** a été suggéré par les travaux de Chaudhuri *et al.* L'analyse ultrastructurale et la réalisation d'immunomarquages ont permis de montrer l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux-like par les HDMECs (Human Dermal Microvascular Endothelial Cells) cultivées pendant 24h en présence d'IL-1 $\beta$  et de TNF- $\alpha$  (Chaudhuri et al. 2007). De manière intéressante, ces résultats ont révélé que 6h après une stimulation par l'IL-1 $\beta$ , il existe une augmentation importante de l'expression du vWF et du collagène IV par les HDMECs. En revanche, cette expression chute dès 24h après la stimulation, et ce jusqu'à 20 jours, soulignant un maintien du phénotype mésenchymateux pour des temps tardifs. Néanmoins, d'autres études s'avèrent nécessaires afin de confirmer la place de l'EndoMT dans le développement de la fibrose cutanée. Enfin, l'EndoMT a été identifiée comme acteur potentiel de la **sclérodermie systémique**. Il s'agit d'une vasculopathie fibroproliférative microvasculaire dont l'étiologie reste à ce jour indéterminée. Elle est caractérisée par une fibrose cutanée progressive et peut également toucher les organes internes et la microvasculature (Jimenez 2013). L'origine des cellules mésenchymateuses activées responsables de l'occlusion microvasculaire reste encore floue mais l'EndoMT semble également jouer un rôle prépondérant dans l'installation de cette pathologie.

La **fibrose intestinale** est également observée en dehors du contexte de l'irradiation chez les patients atteints de maladies inflammatoires chroniques du tube digestif de type maladie de Crohn (MC) et rectocolite hémorragique (RCH) (Rieder et al. 2008). Concernant la MC, les altérations de la muqueuse et de la sous-muqueuse favorisent l'épaississement de la musculaire muqueuse dû à un excès de MEC, pouvant conduire à une atteinte transmurale, un rétrécissement de la lumière du côlon et une augmentation de sa rigidité. Dans le contexte de la RCH, l'inflammation restreinte à la muqueuse est suivie par un épaississement du tissu avec possibilité de strictures et de sténoses. L'activation des fibroblastes en myofibroblastes constitue une étape clef dans l'évolution de ces pathologies. De façon intéressante, l'EndoMT



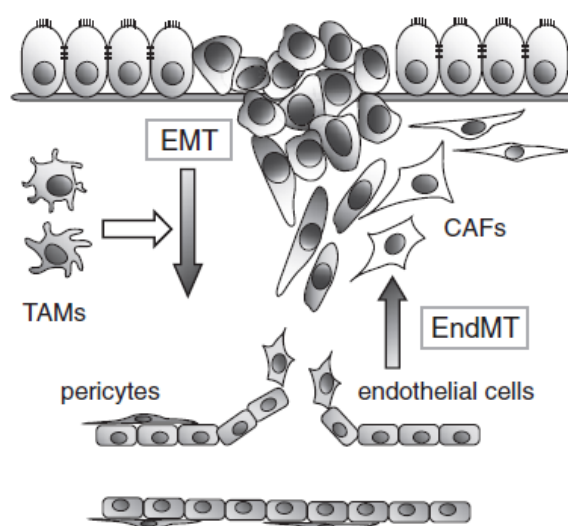
a été mise en évidence *in vitro* dans un modèle de CE microvasculaires intestinales humaines (HIMECs) cultivées en présence de cytokines pro-inflammatoires TGF- $\beta$ 1, IL-1 $\beta$  et TNF- $\alpha$  (Rieder et al. 2011). Les résultats obtenus ont montré que les cellules traitées présentent une perte progressive du phénotype endothélial via la diminution des marqueurs CD31 et VE-cadhérine associée à une acquisition concomitante de l'expression des marqueurs mésenchymateux (vimentine, N-cadhérine et collagène I). De plus, il existe une synergie d'action dans l'induction de l'EndoMT lorsque les HIMECs sont cultivées en présence des trois cytokines pendant 6 jours. Ces précédentes observations ont été confirmées *in vivo* via l'utilisation de souris exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur endothélial Tie2 (Tie2-GFP) dans un modèle de fibrose induite par le TNBS. Ces auteurs ont observé l'EndoMT 8 semaines après la première injection de TNBS qui est corrélée avec le développement de la fibrose intestinale. Enfin, cette étude a mis en évidence pour la première fois le phénomène d'EndoMT *in situ* à partir de tissus de patients atteints de MC et de RCH. L'ensemble de ces résultats renforce donc l'hypothèse que l'EndoMT participe de manière active au développement de la fibrose dans différents tissus, en augmentant le pool de myofibroblastes responsables de la synthèse excessive de MEC (Piera-Velazquez et al. 2011; Piera-Velazquez et al. 2012).

#### **b. EndoMT et cancer : un acteur de la progression tumorale**

Une grande majorité des recherches menées en cancérologie se concentrent sur les altérations génétiques et épigénétiques intrinsèques aux cellules tumorales. La tumeur apparaît comme un organe désorganisé complexe, composé de cellules cancéreuses localisées au sein d'un stroma particulier regroupant une multitude de types cellulaires. On sait aujourd'hui que le microenvironnement tumoral joue un rôle clef dans l'évolution de cette pathologie en influençant une multitude d'aspects du développement tumoral dont la prolifération cellulaire, l'angiogenèse et la formation de métastases (Potenta et al. 2008). Les macrophages et les fibroblastes sont des acteurs cellulaires couramment observés au sein du stroma tumoral, ils sont identifiés respectivement par les termes de TAM (Tumour-Associated Macrophage) et de CAF (Kalluri et al. 2006). La présence en grand nombre des CAF est par ailleurs favorable au développement de la tumeur via la production de signaux oncogéniques et l'expression de TGF- $\beta$  et des MMP1 et 3 associées la dissémination métastatique. Concernant leur origine, il est admis que les CAF peuvent provenir à la fois de la différenciation des cellules épithéliales



via l'EMT mais également des CE, via l'EndoMT (**Figure 27**) (Kalluri et al. 2006; Zeisberg et al. 2007a; Saito 2013). En effet, les travaux de Zeisberg *et al* ont mis en évidence que parmi les cellules  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> du stroma tumoral, 11% des cellules expriment également le CD31 dans un modèle de mélanome chez la souris. Concernant les cellules FSP1<sup>+</sup> périvasculaires, 40% d'entre elles sont également CD31<sup>+</sup>, ce qui suggère que ces cellules possèdent une origine endothéliale (Zeisberg et al. 2007a). Ces mêmes auteurs ont confirmé les précédents résultats via l'utilisation d'un modèle de souris transgéniques exprimant LacZ sous le contrôle du promoteur endothélial Tie2. Après analyse par microscopie confocale, les résultats obtenus ont montré que 30% des cellules FSP1<sup>+</sup> co-expriment la  $\beta$ -galactosidase et 12% des cellules  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup> sont également positives pour la  $\beta$ -galactosidase. Ces travaux démontrent donc par une approche génétique, l'importance de la présence de CAF issus de l'EndoMT dans le microenvironnement tumoral.



**Figure 27** : Rôle de l'EndoMT et de l'EMT dans le développement tumoral (d'après Saito *et al.* 2013).

La dissémination métastatique des tumeurs est un phénomène complexe associé à une importante mortalité des patients. De nombreuses zones de flou subsistent encore quant à la cascade d'événements responsables de la dispersion des cellules tumorales, notamment concernant le rôle potentiel des CE dans la migration transendothéliale paracellulaire (extravasation). C'est dans ce contexte que l'implication de l'EndoMT a été suggérée par les travaux de Krizbai *et al.* Ces derniers ont révélé une relation évidente entre la présence de

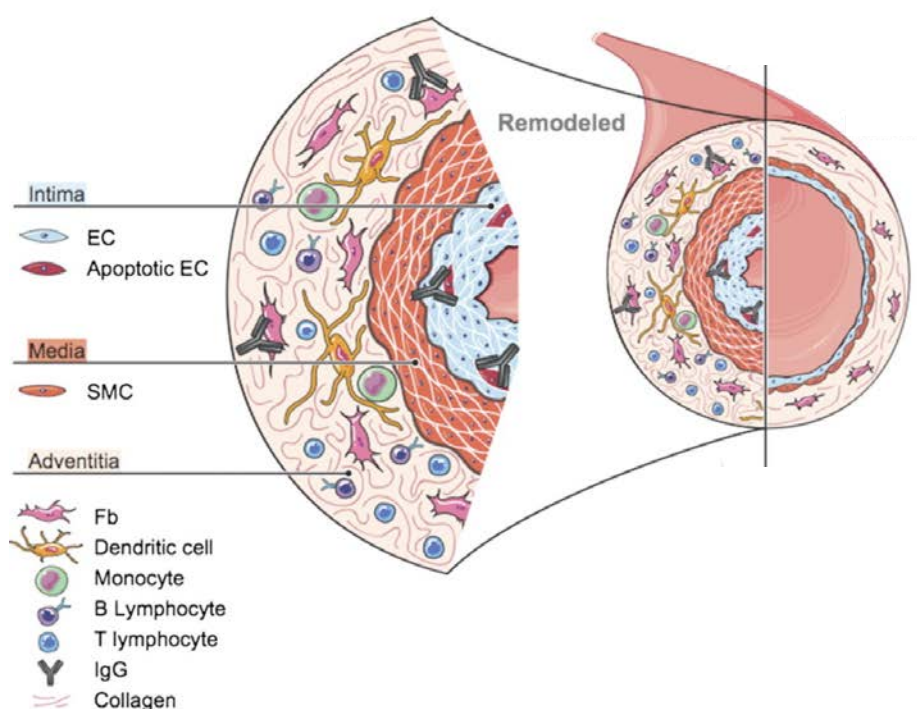
cellules cancéreuses et l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux par les CE en culture. Ces travaux ont également pu montrer que cet effet passe par la sécrétion de TGF- $\beta$ 1 par les cellules tumorales qui favorise l'initiation de l'EndoMT dans deux modèles de CE (Krizbai et al. 2015). De plus, une modification de l'intégrité de la barrière endothéliale, une augmentation de l'adhésion des cellules tumorales à l'endothélium ainsi qu'une augmentation de la transmigration cellulaire ont été observées de façon concomitante à l'EndoMT. Ces récents travaux viennent allonger la liste d'événements pathologiques associés à l'EndoMT et apportent de nouvelles informations quant à la place de ce phénomène dans l'évolution du processus tumoral. Néanmoins, d'autres études s'avèrent nécessaires afin de confirmer la place de l'EndoMT dans la cascade métastatique *in vivo* et chez les patients.

### c. EndoMT et vasculopathies fibroprolifératives

L'EndoMT a également été identifiée comme acteur potentiel d'une maladie auto-immune appelée la **sclérodermie**. Il s'agit d'une vasculopathie fibroproliférative microvasculaire dont l'étiologie reste à ce jour indéterminée. Elle est caractérisée par une fibrose cutanée progressive et peut également toucher les organes internes lorsqu'elle est systémique (Jimenez 2013). L'origine des cellules mésenchymateuses activées responsables de l'occlusion microvasculaire reste encore peu connue mais l'EndoMT semble également jouer un rôle prépondérant dans cette pathologie.

L'**hypertension artérielle pulmonaire** (HAP) est une vasculopathie progressive touchant les vaisseaux pré-capillaires et les artères pulmonaires. Elle est caractérisée par une dysfonction de l'endothélium associée à un remodelage vasculaire pouvant conduire à un rétrécissement de la lumière des vaisseaux (**Figure 28**). Ceci s'explique entre autres par une prolifération accrue des cellules mésenchymateuses (CMLVs) au sein de la lumière vasculaire pouvant conduire à des lésions importantes, voir à des obstructions vasculaires. Cette pathologie est idiopathique ou peut être la conséquence d'une sclérodermie lorsque cette dernière se manifeste au niveau des poumons. Il était admis depuis plusieurs années que cette prolifération des CMLVs était principalement due à l'activation des CMLVs résidentes et des fibroblastes adventitiels ou encore au recrutement des progéniteurs mésenchymateux (Arciniegas et al. 2007). L'intervention de l'EndoMT dans la formation de cellules mésenchymateuses et notamment de CMLs (Frid et al. 2002), a soulevé des questions quant à

son rôle potentiel au cours de cette pathologie. De récents travaux ont pu caractériser l'EndoMT par co-marquage en immunohistochimie localisée au niveau de l'intima d'artérioles pulmonaires chez des patients atteints de HAP (Good et al. 2015), et dans des modèles précliniques de HAP chez la souris et le rat (Ranchoux et al. 2015). Les analyses menées *in vitro* ont permis d'améliorer les connaissances sur les capacités fonctionnelles des cellules en transition. Elles ont confirmé que les cellules en transition acquièrent un phénotype migratoire et pro-inflammatoire via la sécrétion d'IL-4, IL-6, IL-8, IL-13 et TNF- $\alpha$  à un taux comparable avec celui de fibroblastes de patients atteints de HAP. Par la suite, l'étude de la perméabilité paracellulaire a été effectuée par la mesure de différents paramètres biophysiques dont la résistance, l'impédance et la capacité électrique des CE (mesure des invaginations membranaires proportionnelles à la perméabilité cellulaire) des CE. De manière intéressante, les résultats obtenus ont révélé une diminution significative de l'intégrité de la barrière endothéliale associée à une augmentation de la perméabilité vasculaire des cellules en EndoMT (Good et al. 2015).

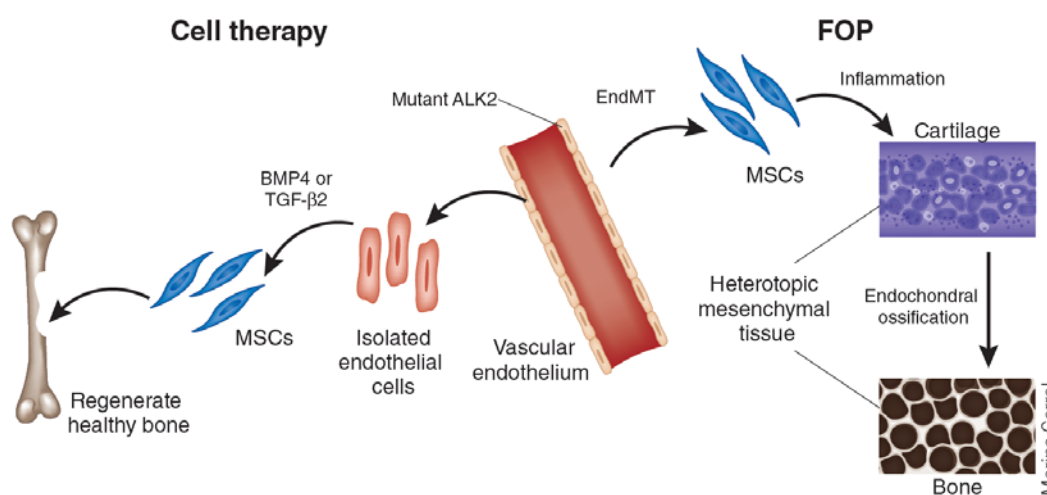


**Figure 28 :** Remodelage vasculaire pulmonaire de l'HAP au cours de la sclérodémie (source [www.institutcochin.fr](http://www.institutcochin.fr)).

Enfin, l'adhésion et la transmigration des leucocytes au travers de la couche endothéliale est une étape clef dans l'initiation de la HAP. L'étude de l'adhésion des PBMCs (Peripheral Blood Mononuclear Cells) à la surface des CE aortiques pulmonaires (PAECs) a révélé une augmentation de l'adhésion des PBMCs à la surface des cellules en EndoMT. L'ensemble de ces résultats confirme donc la présence de l'EndoMT chez les patients atteints de HAP associée à une sclérodermie et que les altérations structurales et fonctionnelles caractéristiques de ce phénomène sont associées avec le remodelage vasculaire impliqué dans l'évolution de la pathologie.

De manière surprenante, les travaux de Medici *et al* ont pu mettre en cause la plasticité endothéliale dans le développement d'une maladie rare appelée la **fibrodysplasie ossifiante progressive** (FOP), également connue comme le syndrome de l'homme de pierre. Cette pathologie est caractérisée par une inflammation aiguë à l'origine d'une ossification hétérotopique aboutissant des formations osseuses au sein des tissus mous (Morales-Piga *et al.* 2014). L'étiologie de cette pathologie provient d'une mutation dans le gène codant pour ALK2 (substitution d'une histidine par une arginine en position 206), ayant pour conséquence une activation constitutive du récepteur I des BMP. C'est en 2001 que des premiers travaux ont révélé que les cellules pro-ostéogéniques et ostéogéniques (chondrocytes et ostéoblastes) expriment les marqueurs endothéliaux Tie2 et vWF (Lewinson *et al.* 2001). Par la suite, les travaux de Medici *et al* ont pu confirmer ces précédentes observations à partir de tissus de patients atteints de FOP (Medici *et al.* 2010). L'utilisation d'une approche génétique, via l'utilisation d'un modèle de souris mutées pour le gène ALK2, a permis de mettre en évidence que la surexpression de ALK2 est associée avec une altération morphologique des CE et une augmentation de l'expression des marqueurs mésenchymateux, elle-même associée à une baisse des marqueurs endothéliaux, caractéristique de l'EndoMT (Medici *et al.* 2010). Suite à la mise en évidence d'une origine endothéliale des cellules mésenchymateuses dans ce modèle préclinique, les auteurs ont donc émis l'hypothèse que l'EndoMT pouvait jouer un rôle dans le développement de cette pathologie. Les résultats obtenus dans cette étude ont permis de montrer *in vitro*, que les cellules en transition expriment un certain nombre de marqueurs de surface spécifiques des cellules souches mésenchymateuses (CD117, CD90, STRO-1, CD71). Ces dernières étant caractérisées par un phénotype multipotent, l'utilisation de milieux conditionnés a permis de montrer de manière élégante à la fois *in vitro* et *in vivo*, que les cellules en transition sont capables de se différencier en chondrocytes, en ostéoblastes

et en adipocytes dans le milieu approprié. De manière générale, ces travaux novateurs ont permis de mettre en évidence que (i) l'EndoMT participe au pool de cellules impliquées dans la FOP ; (ii) les cellules en transition passent par un état de CSM-like avant de se différencier ; (iii) l'endothélium constitue une nouvelle source potentielle de CSM et pourrait être identifié comme un réservoir physiologique. Ces travaux ont également permis d'ouvrir les perspectives de recherche concernant une éventuelle utilisation des CE en thérapie cellulaire dans la régénération osseuse chez des patients atteints d'ostéogenèse imparfaite (**Figure 29**) (Horwitz 2010). Par ailleurs, le phénotype multipotent de ces CSM-like, leur capacité de différenciation et leurs capacités fonctionnelles devront être confirmés chez l'homme.



**Figure 29** : Implication de l'EndoMT dans la fibrodysplasie ossifiante progressive (FOP) et perspectives en thérapie cellulaire dans la régénération osseuse (d'après Horwitz 2010).

#### d. L'EndoMT et pathologies radio-induites

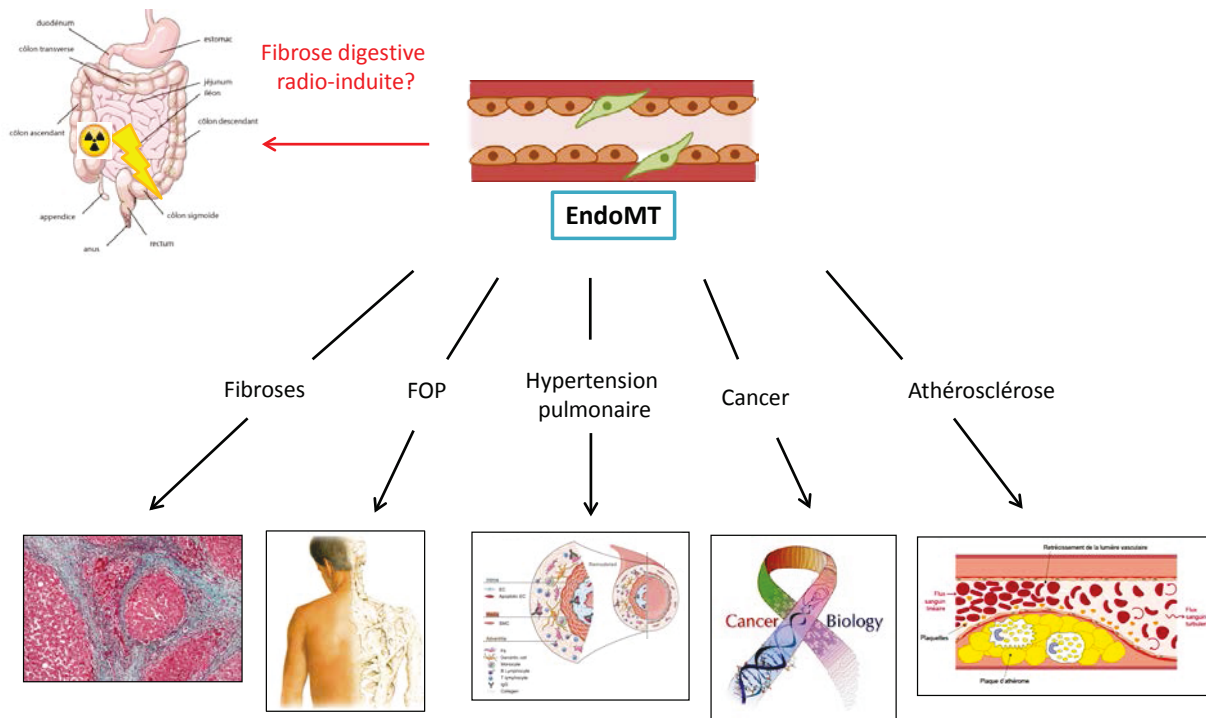
L'accumulation de preuves évidentes reliant l'EndoMT au contexte pathologique a stimulé au cours de ces 10 dernières années, les recherches dans le contexte de pathologies radio-induites. Les travaux de Frid *et al* font partie des premières études associant l'EndoMT à l'irradiation. Bien que ces auteurs n'aient pas utilisé l'irradiation dans le but d'induire l'EndoMT, leurs résultats ont permis de révéler qu'une exposition de 30 Gy favorise l'acquisition d'une morphologie allongée et l'expression d' $\alpha$ -SMA chez les BAECs,

suggérant un processus d'EndoMT (Frid et al. 2002). En 2013, l'équipe de Lee s'est intéressée aux effets secondaires de l'irradiation sur le développement de maladies cardiovasculaires. Ceci s'explique notamment par l'apparition de pathologies secondaires de type athérosclérose accélérée, observées en clinique chez certains patients des années après une radiothérapie thoracique, dont les mécanismes impliqués restent à être élucidés. La réponse inflammatoire soutenue et la présence de fibroblastes sont autant de facteurs qui ont poussé ces auteurs à émettre l'hypothèse que l'EndoMT pouvait être impliquée dans le développement de l'athérosclérose radio-induite. Leurs résultats ont révélé que l'irradiation induit l'EndoMT dans un modèle de CE aortiques humaines (HAoECs) et que cet effet est exacerbé en présence de LDL oxydés (Low Density Lipoprotein), acteurs clefs dans le processus d'athérogenèse (Kim et al. 2013). De plus, lorsque les CE sont traitées avec des LDL oxydés sans être irradiées, ces dernières acquièrent un phénotype mésenchymateux caractéristique de l'EndoMT. Ces résultats ont été confirmés *in vivo* via l'utilisation de souris déficientes pour l'apolipoprotéine E (ApoE<sup>-/-</sup>) qui présentent la caractéristique de former des plaques d'athérome après irradiation. L'analyse par co-marquage en immunofluorescence a révélé la présence de cellules double positives pour le CD31 et l' $\alpha$ -SMA chez ces animaux. Ces résultats révèlent donc que la présence des LDL oxydés suffit à elle seule à induire l'EndoMT et que ce phénomène est accentué par l'irradiation et pourrait participer au développement de la fibrose cardiaque. Enfin, cette même équipe a récemment mis en cause le processus d'EndoMT dans le développement de la fibrose pulmonaire radio-induite. D'un point de vue mécanistique, ces auteurs ont montré que l'irradiation favorise dans un premier temps l'hypoxie tissulaire et l'expression de HIF-1 $\alpha$  (Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$ ), qui à son tour participe à l'activation de l'EndoMT via la voie TGF- $\beta$ /Smad (Choi et al. 2015). L'utilisation d'un agent inhibiteur de HIF-1 $\alpha$  (le 2-ME), permet de bloquer la formation des filaments d'actine cytoplasmiques, l'expression de l' $\alpha$ -SMA et restaure l'expression de la VE-cadhérine. Ces résultats ont été confirmés *in vivo* dans un modèle d'irradiation stéréotaxique pulmonaire de 90 Gy chez la souris où l'injection de 2-ME assure l'inhibition de l'EndoMT et réduit le développement de la fibrose pulmonaire.

L'ensemble de ces résultats permet donc de confirmer l'existence d'un lien reliant l'EndoMT au contexte pathologique chez l'homme adulte (**Figure 30**). Des efforts ont été effectués ces dernières décennies afin d'améliorer les connaissances sur les mécanismes cellulaires et moléculaires de l'EndoMT. Néanmoins, de nombreuses zones d'ombre



subsistent encore concernant l'hétérogénéité phénotypique décrite précédemment et d'autres études sont indispensables afin de mieux définir la place de ce phénomène dans le contexte pathologique.



**Figure 30 : Principales pathologies associées à l'EndoMT.**

#### 4. Régulation de l'EndoMT : un système complexe

L'EndoMT est identifiée dans la littérature comme un **phénomène récent** dont l'amplitude et l'intérêt ne cessent de s'accroître au sein de la communauté scientifique ces dernières années. Ceci s'explique entre autres par son implication dans diverses pathologies dont celles présentées précédemment. La multiplication des études sur la compréhension de ce phénomène a permis d'identifier les voies TGF- $\beta$  et Notch comme des acteurs clefs initiateurs de l'EndoMT, mais également de mettre en lumière la complexité existante au regard des communications entre les nombreux mécanismes régulant ce processus. Comme nous venons de le voir, la présence de cytokines pro-inflammatoires semble être l'évènement environnemental majeur responsable de l'induction de l'EndoMT. La transition des CE

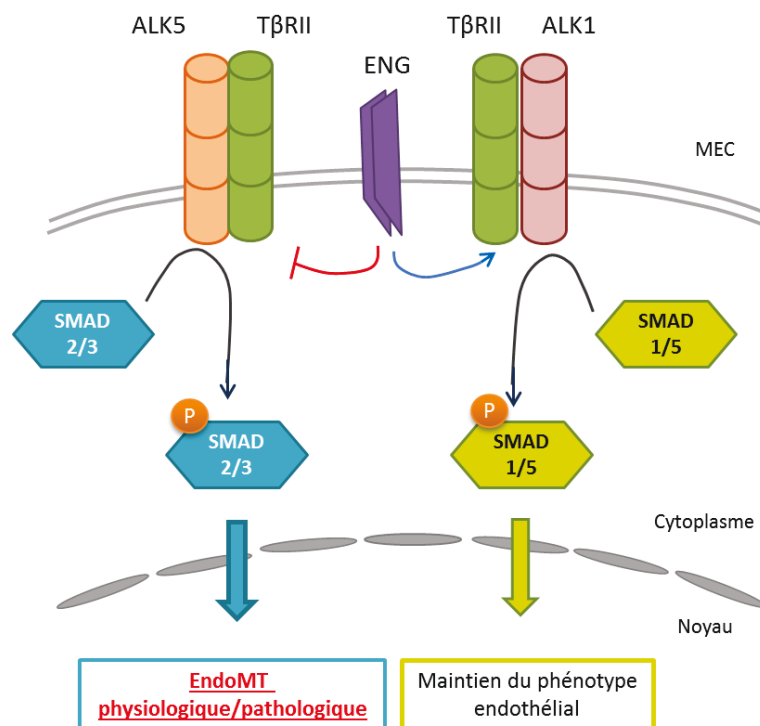


apparaît comme un mécanisme complexe dont l'activation et la spécificité de la signature protéique dépendent de divers facteurs environnementaux, de la nature du tissu et du type de CE (Paruchuri et al. 2006). Au niveau cellulaire, cette spécificité de la signature protéique pourrait s'expliquer par une activation concomitante ou différée de plusieurs voies de signalisation cellulaire majeures en réponse au microenvironnement. A ce jour, deux principales voies de signalisation ont été identifiées comme indispensables à la spécialisation cellulaire précoce et à l'initiation de l'EndoMT. Il est admis que la voie Notch est nécessaire dans la phase d'initiation de l'EndoMT alors que la voie TGF- $\beta$ , en synergie avec la voie Notch, favorise la transdifférenciation des CE en cellules mésenchymateuses et l'invasion du tissu conjonctif. La coopération de ces deux voies assure dans un premier temps la formation des coussins endocardiques, puis enclenche la cascade d'évènements nécessaires à la maturation des valves et du septum. Bien que d'autres voies de signalisation soient également impliquées dans la régulation de l'EndoMT (voie Wnt et BMP), seules les voies les plus décrites, TGF- $\beta$  et Notch seront développées dans la suite de ce chapitre.

#### **a. Le TGF- $\beta$ : un acteur clef dans l'induction de l'EndoMT**

Le rôle du TGF- $\beta$  dans l'acquisition du phénotype myofibroblastique via l'EndoMT est aujourd'hui incontesté. De nombreux travaux ont corrélié à la fois *in vitro* et *in vivo* chez l'animal, mais aussi chez l'homme, la présence de cette cytokine avec l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux par les CE aussi bien dans un contexte physiologique (Arciniegas et al. 1992; Goumans et al. 2008), que pathologique (Lin et al. 2012). Par ailleurs, la cinétique d'expression temporelle et spatiale des trois isoformes du TGF- $\beta$  serait à la base de la valvulogenèse. En effet, l'expression précoce des TGF- $\beta$ 1 et 2 au niveau de l'AVC et de l'endocarde suggère que ces ligands jouent un rôle dans l'induction de l'EndoMT embryonnaire, tandis que l'expression plus tardive du TGF- $\beta$ 3 restreinte aux coussins endocardiques, serait impliquée dans le remodelage et la maturation des valves (Garside et al. 2013). En plus de la valvulogenèse, l'EndoMT dépendante de la voie TGF- $\beta$ -Smad2/3 a également été mise en évidence dans le remodelage vasculaire dans un modèle d'interposition d'un greffon veineux dans l'artère fémorale chez l'homme et la souris, soutenant la place centrale de cette voie de signalisation dans l'EndoMT (Cooley et al. 2014). Bien que les cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , IL-6 et TNF- $\alpha$ ) soient également capables d'induire l'EndoMT *in vitro*, la présence du TGF- $\beta$  semble indispensable pour favoriser l'acquisition

d'un phénotype mésenchymateux-like robuste et stable dans le temps (Sommer et al. 2005; Zeisberg et al. 2007b; Hashimoto et al. 2010; Rieder et al. 2011). De plus, le TGF- $\beta$ 2 apparaît comme l'isoforme capable d'induire l'EndoMT de manière la plus robuste (phénotype myofibroblastique établi) en comparaison avec le TGF- $\beta$ 1 et le TGF- $\beta$ 3 (Paruchuri et al. 2006; Zhou et al. 2014b). D'un point de vue mécanistique, ces différences d'efficacité dans l'induction de l'EndoMT s'expliquent par la nature du récepteur au TGF- $\beta$  activé. En effet, le TGF- $\beta$  influence la plasticité endothéliale grâce à la présence de deux types de récepteurs présents à la surface des CE : le récepteur ALK5/T $\beta$ RII favorise l'activation des Smads 2/3 et l'initiation de l'EndoMT (Montorfano et al. 2014); le récepteur ALK1/T $\beta$ RII favorise quant à lui l'activation de la voie des Smads 1/5 et la prolifération endothéliale (Figure 31) (van Meeteren et al. 2012). En conditions basales, l'inhibition de l'EndoMT est assurée par l'action du T $\beta$ RIII ou Endogline qui favorise la prolifération cellulaire via ALK1/T $\beta$ RII et empêche l'activation du récepteur ALK5/T $\beta$ RII (Zhou et al. 2014b).



**Figure 31** : Rôle de la voie TGF- $\beta$  dans l'équilibre stimulation/inhibition de la prolifération endothéliale.

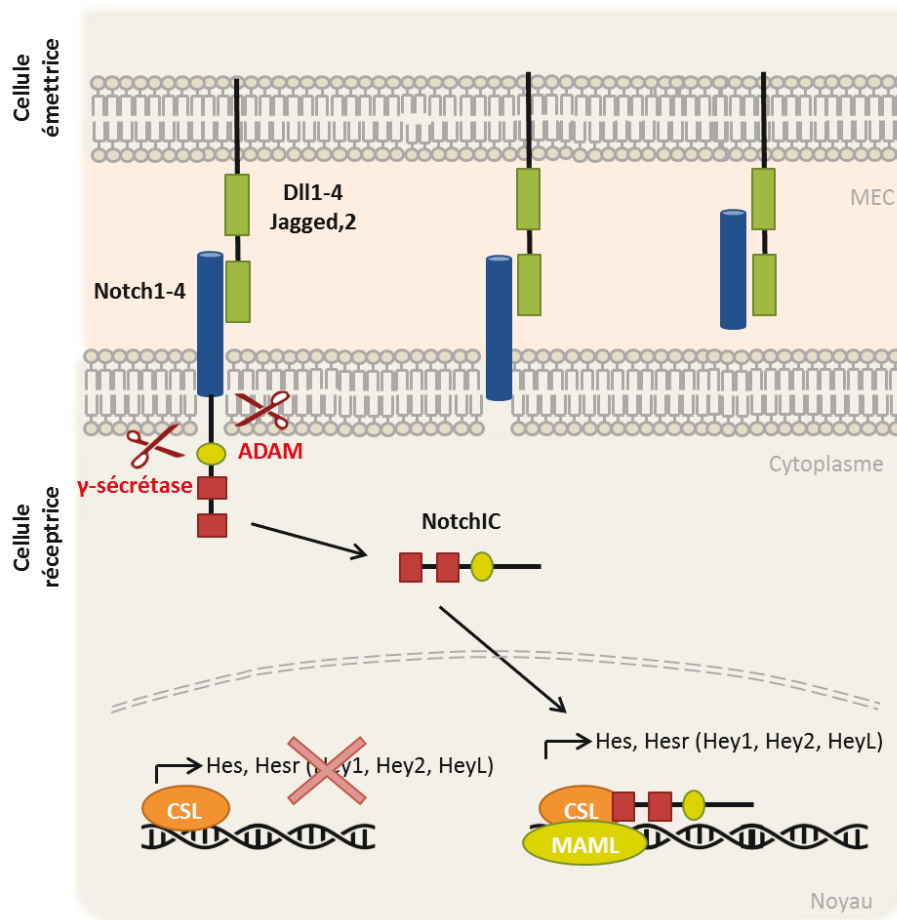
Au niveau moléculaire, l'activation de la voie TGF- $\beta$  favorise l'expression de nombreux facteurs de transcription jouant un rôle prépondérant dans la plasticité endothéliale à la fois dans un contexte physiologique et pathologique ([van Meeteren et al. 2012](#)). Parmi eux, les facteurs de transcription Snail-1, Slug (ou Snail-2), ZEB1 (Zinc finger E-box-Binding homeobox 1), SIP1 (Smad Interacting Protein 1) et Twist ont été identifiés comme impliqués dans l'induction de l'EMT ([Yoshimatsu et al. 2011](#); [Saito 2013](#)). L'existence de nombreuses similitudes entre l'EMT et l'EndoMT ont permis d'orienter les recherches mécanistiques sur l'EndoMT vers ces principaux effecteurs. Les résultats obtenus *in vitro* s'accordent à démontrer l'importance de ces effecteurs dans le processus d'EndoMT en réponse au TGF- $\beta$ 2 dans différents types cellulaires, avec une implication particulière des facteurs Snail-1 et Slug ([Paruchuri et al. 2006](#); [Kokudo et al. 2008](#)). La place centrale du TGF- $\beta$ 2 dans l'induction de l'EndoMT a été confirmée via l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique du T $\beta$ R-I qui est associée avec une réduction de l'expression de Snail-1 et une conservation du phénotype endothélial ([Kokudo et al. 2008](#)). Snail-1 est un facteur de transcription en doigt de zinc capable de s'associer et de former un complexe avec les protéines Smad3 et Smad4. Ce complexe activé cause l'inhibition des protéines des jonctions cellulaires type E- et VE-cadhérine en se fixant au sein d'une région spécifique du promoteur de ces gènes, et favorise l'expression des protéines mésenchymateuses ([Lopez et al. 2009](#); [Jimenez 2013](#)). Bien que Snail-1 soit impliqué dans l'EndoMT, il a cependant été montré que son expression ne suffit pas à elle seule à induire la transition, suggérant la présence concomitante d'autres acteurs cellulaires nécessaires au switch phénotypique des CE. Cette hypothèse a été confirmée par les travaux de Medici *et al* qui ont montré que l'expression de Snail-1 dépend à la fois de l'activation de la voie dépendante des Smads, via Smad4, mais également via une voie indépendante faisant intervenir les protéines PI3K (Phosphoinositide 3-kinase)/AKT (ou PKB, Protein Kinase B), la p38 MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) et ERK1/2 (Extracellular signal-Regulated Kinases 1/2) ([Medici et al. 2011](#)). Ces mêmes auteurs ont pu confirmer que l'expression de Snail-1 est dépendante de la voie GSK-3 $\beta$  (Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$ ). En conditions basales, l'expression de Snail-1 est bloquée par l'action de la GSK-3 $\beta$ , mais la présence du TGF- $\beta$ 2 entraîne une activation de la PI3K qui assure à son tour l'activation d'AKT. L'activation de cette dernière protéine va avoir pour conséquence une inhibition par phosphorylation de la GSK-3 $\beta$  et *in fine*, une augmentation de l'expression de Snail-1 impliquée dans l'EndoMT ([Medici et al. 2011](#)).

Le TGF- $\beta$  ayant une action pléiotropique, sa fixation sur son récepteur stimule l'activation parallèle de plusieurs voies de signalisation intracellulaire impliquées dans la régulation de l'expression de Snail-1 ([van Meeteren et al. 2012](#)). Il a par exemple été montré que l'activation du récepteur au TGF- $\beta$  favorise l'activation des protéines c-Abl (c-Abelson tyrosine kinase) et la PKC- $\delta$  (Protein Kinase C- $\delta$ ), qui sont impliquées dans la prolifération et la différenciation cellulaire ([Li et al. 2011](#)). De manière intéressante, l'absence de FGF dans le milieu de culture de CE humaines favorise l'acquisition d'un phénotype CML-like au bout de 14 jours, caractérisé par l'expression de la calponine et de la SM22 $\alpha$ , et par à l'activation des isoformes de la PKC. Ceci s'explique notamment par une diminution de l'expression des miRNA de la famille let-7 en absence de FGF, dont le rôle est de maintenir un faible niveau d'expression du T $\beta$ R-I à la surface des CE ([Chen et al. 2012](#)). L'utilisation d'inhibiteurs de la PKC permet de prévenir le phénotype mésenchymateux causé par l'absence de FGF mettant en évidence son rôle dans l'EndoMT ([Ishisaki et al. 2004](#)). Ces précédents résultats ont été confirmés via l'utilisation d'autres inhibiteurs pharmacologiques de c-Abl et de la PKC- $\delta$  (l'Imatinib et la Rottlerin) dont la présence est associée avec une diminution de l'expression de Snail-1 induite par le TGF- $\beta$  et une réduction de l'EndoMT dans un modèle de CE pulmonaires de souris ([Li et al. 2011](#)). En revanche, l'inhibition respective de c-Abl et de la PKC- $\delta$  n'a aucune influence sur la phosphorylation de Smad 2/3 révélant que l'activation de la voie des Smads se fait de façon indépendante de l'activation de ces deux protéines.

#### **b. La voie Notch dans l'initiation de l'EndoMT**

La voie canonique Notch est un système de signalisation hautement conservé au cours de l'évolution et est indispensable au développement embryonnaire chez les vertébrés. Elle contrôle le devenir cellulaire, l'organogenèse, et joue un rôle particulier dans le développement cardiovasculaire (formation des valves) ainsi que dans la morphogenèse et le remodelage vasculaire chez l'homme. La présence de mutations dans les gènes acteurs de cette voie peut conduire à sa dysfonction et est sans surprise associée à de graves pathologies souvent létales pour l'homme ([Lai 2004](#)). Tout comme pour la voie du TGF- $\beta$ , la voie Notch influence le devenir cellulaire (prolifération, différenciation et aussi l'apoptose) en contrôlant l'expression d'une multitude de gènes via l'activation ou au contraire, la répression de facteurs de transcription tissus spécifiques. A ce jour, quatre récepteurs membranaires ont été identifiés : Notch1 à 4, et cinq ligands (Delta-like) Dll1, Dll3, Dll4, Jagged1 et Jagged2, dont

l'expression est observée dans la plupart des types cellulaires et particulièrement dans les CE cardiaques (Nosedá et al. 2004; Bray 2006). L'interaction entre un récepteur Notch (cellule réceptrice) et son ligand (cellule émettrice) entraîne une cascade de clivages protéolytiques du récepteur d'abord initiée par l'action de métalloprotéases de la famille ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase). Puis, un second clivage par la  $\gamma$ -sécrétase permet la libération du fragment C-terminal intracellulaire appelé NotchIC (**Figure 32**). Après la translocation nucléaire de ce fragment, ce dernier agit comme un signal de coactivation en s'associant avec les protéines CSL liées à l'ADN, à savoir CBF1/RBP-J $\kappa$  (Recombining Binding Protein suppressor-J $\kappa$ ) / Su(H) / LAG-1 et son coactivateur Mastermind (MAML, MAsterMind-Like protein) (Bray 2006). Ainsi, la voie Notch activée assure la transactivation de gènes cibles dont les répresseurs transcriptionnels appartenant à la famille Hes (Hairy and Enhancer of Split), à la famille Hesr ou Hey (Hairy/Enhancer of split-related with YRPW motif) et Lunatic fringe (Lnfg) (Mayeuf et al. 2011). Ces acteurs, aussi bien les ligands/récepteurs que les gènes cibles, sont retrouvés surexprimés au stade embryonnaire au niveau du cœur avec une activation de cette voie particulièrement soutenue par les CE et les cellules périvasculaires (Saito 2013). Une inactivation de cette voie (délétion de RBP-J $\kappa$ ) entraîne une létalité embryonnaire chez la souris et est associée avec une réduction de la différenciation des cellules épicaudiques et périvasculaires en cellules musculaires (Saito 2013). Enfin, seul un nombre restreint de gènes cibles de la voie Notch a été identifié à ce jour dont la majorité appartient aux familles Hes et Hesr/Hey, plaçant ces derniers comme les principaux effecteurs de cette voie.



**Figure 32** : Principaux acteurs de la voie canonique Notch. Fixation d'un récepteur Notch (1-4) présent à la surface d'une cellule réceptrice avec son ligand (Dll 1-4 ou Jagged 1-2) exprimé par une cellule émettrice. Libération du fragment intracellulaire de Notch (NotchIC) par clivage protéolytique initié par la métalloprotéinase de la famille ADAM (A Disintegrin And Metalloproteinase), suivie de l'action de la  $\gamma$ -sécrétase. Translocation nucléaire de NotchIC et fixation sur ses gènes cibles (gènes codant pour les facteurs de transcription de la famille Hes-Hey).

Le rôle de la voie **Notch** dans l'**induction de l'EndoMT** physiologique a été mis en évidence au cours de la valvulogénèse cardiaque pour la première fois en 2004 grâce aux travaux de Nosedá *et al.* Les résultats obtenus par cette équipe ont permis de révéler que la surexpression des fragments intracellulaires Notch1IC et Notch4IC, ainsi que le ligand Jagged1, suffit à elle seule à induire des changements morphologiques et protéiques caractéristiques de l'EndoMT (Nosedá *et al.* 2004). Cette même équipe a montré pour la première fois que la voie Notch joue un rôle essentiel dans la régulation de l'expression de l' $\alpha$ -SMA par les CE aussi bien au cours de l'EndoMT, mais également par les fibroblastes et les CMLs, et cet effet est dépendant de CSL (Kalluri 2009). De façon intéressante, il a été

montré que l'EndoMT dépendante de Notch est restreinte aux cellules exprimant les récepteurs Notch activés et ne dépend pas de l'activation de facteurs exogènes. Enfin, ces travaux ont pu confirmer *in vivo* par technique d'hybridation *in situ*, que l'expression des fragments Notch1, 4 et de Jagged1 coïncide de façon spatiale et temporelle avec l'observation de l'EndoMT au cours du développement, à savoir entre 9,5 et 10,5 jours embryonnaires. Ces observations ont par la suite été corroborées par d'autres travaux montrant l'activation de la voie Notch au sein de l'endocarde embryonnaire (Timmerman et al. 2004).

Par la suite, l'utilisation de modèles de souris transgéniques a permis de mieux définir la place de la voie Notch dans l'induction de l'EndoMT *in vivo*. De manière surprenante, il a été montré que les souris surexprimant Notch1 spécifiquement dans le compartiment endothélial montrent une désorganisation du réseau vasculaire ainsi que des altérations majeures de l'architecture de ce dernier (hémorragies), associées à une importante mortalité de ces animaux entre 9,5 et 10,5 jours embryonnaires (Liu et al. 2014). Au niveau moléculaire, l'activation de la voie Notch est associée avec une importante expression de Snail1 et des marqueurs mésenchymateux ainsi qu'une diminution des protéines endothéliales, au niveau des valves cardiaques (Timmerman et al. 2004; Liu et al. 2014). Ces résultats ont permis de confirmer que la surexpression de Notch1 induit une EndoMT endocardique excessive qui est corrélée avec un élargissement du myocarde et la formation de valves hyperplasiques. Dans le cas contraire, les analyses histologiques de tissus d'embryons de poissons ayant reçu par injection un inhibiteur de Notch ont révélé la présence d'une atrophie des coussins endocardiques confirmant la place essentielle de la voie Notch au cours de l'embryogenèse (Timmerman et al. 2004). D'autres travaux ont pu mettre en lumière le rôle de la voie Notch dans l'induction de l'EndoMT dans un modèle de CE de cornée. Dans cette étude, l'acquisition du phénotype mésenchymateux est associée avec une augmentation des acteurs de la voie Notch et l'ajout d'un inhibiteur de la  $\gamma$ -sécrétase permet d'inhiber la transition des CE, confirmant l'importance de cette voie dans l'initiation de l'EndoMT (Li et al. 2013).

### c. Hey2 : un acteur potentiel de l'EndoMT dépendante de Notch

Parmi les gènes régulés par la voie Notch, ceux de la **famille Hesr/Hey** sont identifiés comme les principales cibles directes de cette voie, et constituent donc des acteurs potentiels



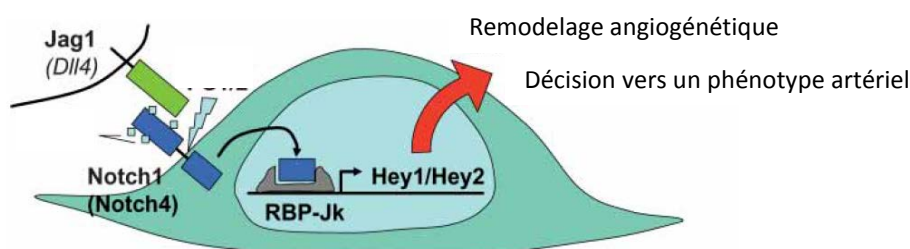
dans la régulation de l'EndoMT. Comme nous le verrons de manière plus détaillée dans la partie Discussion & Perspectives, ce travail de thèse s'est également concentré sur le rôle potentiel du facteur de transcription Hey2 dans l'induction de l'EndoMT dans le développement de la fibrose intestinale radio-induite. Pour cette raison, le prochain paragraphe sera essentiellement orienté vers cet acteur et dressera le bilan des connaissances actuelles sur ce dernier.

Les membres de la famille Hesr/Hey sont identifiés comme les principaux effecteurs de la voie Notch au cours du développement (Iso et al. 2003). Ils jouent un rôle essentiel au cours de la valvulogenèse, de la vasculogenèse et participent à la différenciation neuronale ainsi qu'au remodelage osseux (Fischer et al. 2003; Zanotti et al. 2013). Ces gènes codent pour des facteurs de transcription de type bHLH (basic Helix-Loop-Helix), motif particulier autorisant leur liaison à l'ADN des gènes cibles. On distingue chez l'homme et la souris trois gènes appartenant à cette famille, Hey1, -2, -Like (-L), qui agissent en tant que répresseurs transcriptionnels tissu-spécifiques (Iso et al. 2003; Kokubo et al. 2005a). Au cours de l'embryogenèse, seuls Hey1 et Hey2 montrent un profil d'expression dynamique dans la formation du cœur entre 8,5 et 10,5 jours embryonnaires chez la souris et le rat (Leimeister et al. 1999; Chin et al. 2000), et l'observation d'une expression temporelle similaire suggère une certaine redondance dans leurs fonctions biologiques. Leur expression chute après la naissance, lorsque la maturation cardiaque est atteinte, et devient quasiment indétectable dans le cœur adulte. Hey2 reste néanmoins exprimé de manière importante au niveau de l'aorte chez l'homme adulte (Chin et al. 2000).

Les mécanismes régulant l'expression de ces facteurs sont actuellement mal connus et les fonctions biologiques restent à être déterminées de manière plus précise. On sait seulement aujourd'hui que ces facteurs sont indispensables à la cardiogenèse et la morphogenèse vasculaire. Chez l'homme, la présence de deux mutations silencieuses a été observée au sein du gène Hey2 sans pour autant être corrélée avec le développement de maladies congénitales cardiaques (Fischer et al. 2004a). *In vivo*, la génération de modèles KO pour chacune de ces trois isoformes a permis de révéler que les délétions de Hey1 et HeyL ne sont pas délétères pour les animaux (absence de phénotype particulier) (Fischer et al. 2004b), en revanche la délétion spécifique de Hey2 entraîne des retards de croissance et des cardiomyopathies sévères (valves hypoplasiques) associés à une létalité autour des 10 premiers jours (Sakata et al. 2002; Kokubo et al. 2013). De plus, la génération d'un modèle de souris double KO pour

Hey1 et Hey2 (Hey1<sup>+/-</sup> Hey2<sup>-/-</sup>) est associée avec une létalité à l'âge adulte et présente un phénotype similaire à celui observé lors d'une délétion globale de Notch1 (Fischer et al. 2004b). Ceci permet de confirmer le rôle essentiel de Hey2 dans la l'ontogenèse cardiaque.

Malgré ces observations, l'analyse individuelle des gènes Hesr/Hey n'a pas permis de déterminer le rôle précis de chacun de ces facteurs dans les événements cellulaires cardiovasculaires dépendants de la voie Notch. De plus, le phénotype causé par la délétion des gènes Hesr/Hey paraît être variable selon le fond génétique et l'espèce animale utilisée, rendant la compréhension de cette voie plus complexe (Sakata et al. 2002; Fischer et al. 2004a). En effet, l'inhibition de l'homologue de Hey2 chez le poisson zèbre, Gridlock, est associée à des altérations du système vasculaire alors que chez la souris, cette même délétion engendre essentiellement des malformations cardiaques sans causer d'atteintes vasculaires majeures (Fischer et al. 2003). La variabilité de ces phénotypes peut s'expliquer par une redondance partielle et une complémentarité entre les fonctions des facteurs Hesr/Hey dans le développement vasculaire (Sakata et al. 2002; Fischer et al. 2004b). Néanmoins, les connaissances actuelles sur ces facteurs de transcription permettent d'associer leur expression avec l'identité de la lignée vasculaire artérielle/veineuse (Figure 33). En effet, la co-expression de Hey1 et Hey2 serait favorable à la spécialisation endothéliale vers un phénotype artériel via l'expression de l'éphrine-B2, le CD44 et la neuropiline1 (Chi et al. 2003). Cependant, aucune étude n'a pour le moment démontré de façon formelle comment les gènes Hey orientent le devenir des angioblastes. D'autres études s'avèrent donc nécessaires afin de déterminer comment ces facteurs participent à la maturation endothéliale (Fischer et al. 2004b).



**Figure 33 :** Transduction du signal Notch1/Jag1/Hey1-Hey2 dans la cellule endothéliale : contrôle de la spécialisation artérielle (d'après Fischer et al. 2004).

Concernant les mécanismes associés aux facteurs Hey, les travaux de Kokubo *et al* ont pu montrer une relation entre la double inactivation de Hey1 et Hey2 chez la souris et une diminution du processus d'EndoMT au sein des valves (Kokubo *et al.* 2005b). De plus, la délétion génétique de Hey2 entraîne des malformations des valves suggérant qu'Hey2 serait un acteur majeur dans la régulation ces phénomènes. Par ailleurs, une étude portant sur le remodelage vasculaire a permis de relier l'expression d'Hey2 à l'ontogenèse vasculaire *in vivo*. De façon intéressante, ces auteurs ont constaté une diminution de la prolifération et de la migration des CMLVs en réponse au PDGF et à l'HB-EGF (Heparin-Binding Epidermal Growth Factor) dans un modèle de souris déficientes pour Hey2 (Hey2<sup>+/-</sup>) (Sakata *et al.* 2004). Enfin, quelques études ont pu mettre en relation la surexpression de Hey2 avec le processus d'EndoMT dans des contextes de sarcome de Kaposi, et de surexpression de RUNX3 (Runt-related transcription factor 3), une autre cible de Notch (Fu *et al.* 2011; Gasperini *et al.* 2012). L'ensemble de ces résultats vient donc soutenir l'hypothèse quant au rôle de Hey2 dans la régulation de l'EndoMT et l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux/migratoire par les CE. L'éventuelle participation de Hey2 dans l'EndoMT radio-induite constitue une perspective de recherche attrayante et d'autres études sont nécessaires afin de déchiffrer les mécanismes moléculaires situés en aval de Hey2.

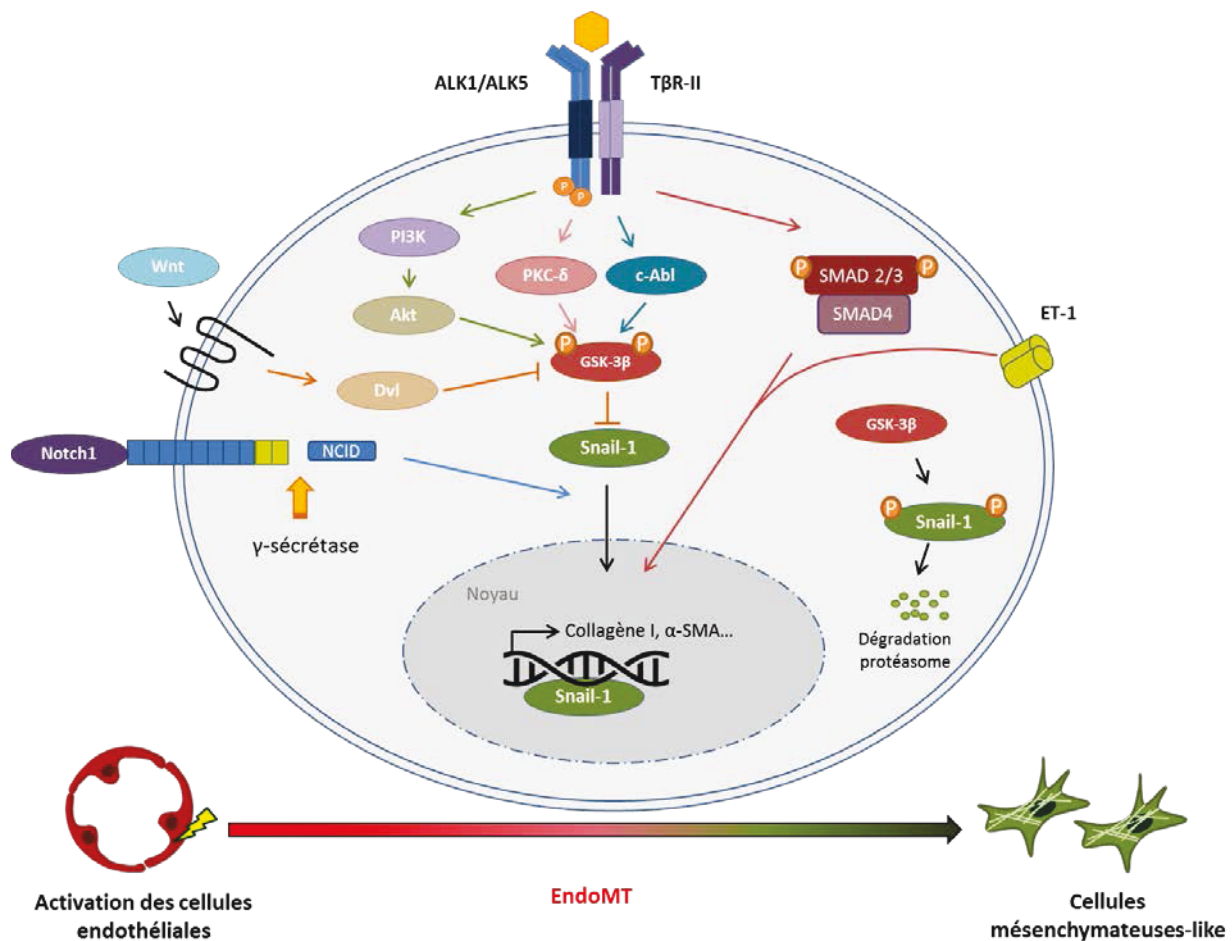
#### **d. Interaction des voies Notch et TGF- $\beta$ dans l'induction de l'EndoMT**

L'hypothèse d'une interaction/synergie entre les voies TGF- $\beta$  et Notch dans l'induction de l'EndoMT a été suggérée suite à l'observation de nombreuses similarités phénotypiques et l'existence de gènes cibles communs à ces voies (Garside *et al.* 2013). Les travaux de Fu *et al* ont permis une avancée significative concernant les mécanismes moléculaires régissant l'activation de ces deux voies au sein de l'endothélium. Leurs travaux novateurs ont révélé qu'une inhibition pharmacologique de Notch permet de réduire l'expression de Smad3 induite par le TGF- $\beta$ . Ceci suggère que Notch régule les gènes cibles de la voie TGF- $\beta$ . Au niveau moléculaire, cet effet passe par une inhibition des R-Smads ALK1/Smad1, de ALK5/Smad2, et une activation d'ALK5/Smad3 et de ses gènes cibles PAI-1, Hey1, Hey2, HeyL et CTGF (Fu *et al.* 2009). Ces auteurs ont également mis en évidence l'existence d'une synergie entre Notch et TGF- $\beta$  qui passe par le recrutement de Smad3 et l'expression accrue de ses gènes cibles. D'autres études ont confirmé ces précédentes observations et ont révélé que la voie Notch agit en amont de la voie TGF- $\beta$  et contrôle

également l'expression de gènes indispensables à la différenciation des CE en cellules musculaires, à savoir l' $\alpha$ -SMA et la SM22 $\alpha$ . Nosedo *et al* ont en effet pu montrer que l' $\alpha$ -SMA est une cible directe de la voie Notch (Nosedo *et al.* 2006). Ceci appuie par ailleurs le rôle de Notch dans l'induction de l'EndoMT. Ce dernier point a été confirmé par les travaux de Timmerman *et al* qui ont mis en évidence une diminution de l'expression du TGF- $\beta$ 2 ainsi qu'une réduction de l'EndoMT dans des embryons de souris déficients pour Notch1 et RBP-J $\kappa$  (Timmerman *et al.* 2004).

La présence d'interactions complexes entre ces deux voies a de même été appuyée par l'identification d'effecteurs communs, à savoir les facteurs de transcription de la famille Snail. En effet, plusieurs travaux s'accordent à démontrer *in vitro* que l'activation de la voie Notch est corrélée avec la surexpression des facteurs de transcription Snail1 et Slug, facteurs également identifiés comme les principaux effecteurs de la voie TGF- $\beta$  (Niessen *et al.* 2008; Liu *et al.* 2014). Cependant, certaines discordances subsistent quant aux gènes cibles régulés par la voie Notch. En effet, il a été montré que l'activation de Notch est corrélée avec une surexpression de Snail1, sans influence sur Slug (Timmerman *et al.* 2004). Au contraire, Niessen *et al* ont observé dans leurs conditions que la surexpression de Notch favorise l'expression de Slug et n'a pas d'influence sur celle de Snail1 (Niessen *et al.* 2008). Ces derniers expliquent que ces différences pourraient être dues à l'influence du microenvironnement sur l'activation cellulaire.

Bien que certaines interrogations persistent sur l'identité exacte des gènes régulés par Notch, peu de doutes existent quant à la réalité d'interactions fonctionnelles entre les voies Notch et TGF- $\beta$  (Kluppel *et al.* 2005). Notch apparaît comme un modulateur direct de la voie TGF- $\beta$  en régulant positivement/négativement les effecteurs de cette dernière. Ainsi, ces deux voies participent ensemble de manière indépendante et synergique dans l'initiation et la régulation de l'EndoMT dans le développement des valves cardiaques au cours de l'embryogenèse (**Figure 34**).



**Figure 34 :** Représentation simplifiée des principales voies de signalisation intracellulaire impliquées dans l'EndoMT (adapté à partir de Jimenez 2011). Implication des voies TGF-β-Smad 2/3 ; de la voie Notch, de la voie Wnt et de l'Endothéline-1 (ET-1) dans l'induction de l'EndoMT.

## 5. L'EndoMT comme cible thérapeutique anti-fibrosante

Comme nous venons de le voir tout au long de ce chapitre, l'EndoMT est un processus récent et depuis peu mis en cause dans le développement de la fibrose de différents tissus. Bien qu'il soit actuellement difficile d'évaluer la part de responsabilité de ce phénomène dans la fibrose, son inhibition est apparue comme une stratégie thérapeutique innovante ces dernières années. De façon intéressante, l'administration de certains facteurs de croissance, tel que le HGF, s'avère bénéfique dans des contextes fibrotiques. *In vivo*, l'utilisation d'un

modèle de souris surexprimant le HGF a pu mettre en évidence une diminution significative de la fibrose cardiaque associée à une réduction de l'expression des marqueurs de la fibrose (Okayama et al. 2012). Concernant les mécanismes mis en jeu, ces travaux ont pu montrer que cette diminution est corrélée avec l'inhibition du processus d'EndoMT chez les animaux. Ceci suggère que ce processus occupe une place non négligeable dans l'évolution de la fibrose cardiaque dans ce modèle. Comme évoqué précédemment, la voie canonique du TGF- $\beta$  joue un rôle central dans l'induction de l'EndoMT dans de multiples pathologies. L'inhibition spécifique de cette voie constitue donc une cible de choix, stratégie la plus couramment utilisée dans l'inhibition de l'EndoMT. Chez la souris, l'injection d'anticorps anti-TGF- $\beta$ 1 et l'inhibition de ses effecteurs (Smad2/3) par l'utilisation d'ARN interférents, est associée avec une réduction significative du nombre de cellules en EndoMT ainsi qu'à une diminution de l'épaississement néointimal couramment observé dans un contexte de greffe veineuse (Cooley et al. 2014). De manière plus précise, ces mêmes auteurs ont montré que l'activation des Smads 2 et 3 favorise la transcription des gènes cibles Snail1, Slug et Twist, directement impliqués dans le processus d'EndoMT aussi bien chez la souris que chez l'homme. Une autre étude récente a pu montrer qu'une l'inhibition partielle du TGF- $\beta$  (souris T $\beta$ R-II<sup>+/-</sup>), est associée avec une réduction de l'EndoMT, une augmentation de l'angiogenèse ainsi qu'une amélioration globale de la fibrose chez les animaux (Xavier et al. 2015). L'inhibition spécifique des effecteurs de la voie TGF- $\beta$  constitue également une approche intéressante. L'administration continue de l'inhibiteur spécifique de Smad3 (SIS3) entraîne une inhibition de l'EndoMT et une réduction significative du nombre de myofibroblastes dans un modèle de néphropathie diabétique chez la souris (Li et al. 2010). Les travaux de Zeisberg *et al* ont quant à eux démontré le rôle bénéfique du rhBMP-7 sur les fibroses rénale et cardiaque via une inhibition des processus d'EMT et d'EndoMT. Au niveau moléculaire, cet effet passe par une activation de la voie des Smads 1/5/8 ainsi qu'une stimulation des promoteurs de la E- et VE-cadhérine (Zeisberg et al. 2007b)

Un certain nombre de recherches s'oriente actuellement vers le développement et l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques de l'EndoMT avec l'obtention de résultats très encourageants. Wu *et al* ont par exemple montré le rôle bénéfique de l'administration du Cinacalcet (CINA), un agent mimétique du calcium, dans la réduction des fibroses rénale et cardiaque chez le rat (Wu et al. 2014a; Wu et al. 2014b). Ces auteurs ont pu montrer que cet effet passe par une diminution du taux sérique de la PTH (ParaThyroid Hormone) qui est

directement corrélée avec l'inhibition de l'EndoMT et le développement de la fibrose. Des résultats similaires ont été observés après injection de Scutellarine, molécule d'origine végétale utilisée dans les pathologies cérébrovasculaires possédant des propriétés anti-apoptotiques, anti-inflammatoires et antioxydantes. L'utilisation de cette molécule est associée avec une amélioration des fonctions cardiaques, une inhibition de l'EndoMT et une réduction de la fibrose cardiaque chez le rat (Zhou et al. 2014a). Enfin, l'utilisation du Losartan, un inhibiteur de l'angiotensin II-receptor-1 (AT-1), a également montré des résultats prometteurs concernant l'inhibition de l'EndoMT dépendante de la voie TGF- $\beta$  non canonique *in vitro* (Wylie-Sears et al. 2014). Par ailleurs, cette molécule est utilisée en essais cliniques (phase I et II) chez des patients atteints du syndrome de Marfan (affection du tissu conjonctif) (Akhurst et al. 2012), et d'autres études sont nécessaires afin de confirmer son rôle dans l'inhibition de l'EndoMT *in vivo*.

Le nombre d'études reliant l'EndoMT au contexte pathologique a considérablement augmenté ces dix dernières années. Ce phénomène apparaît comme un acteur central du processus pathologique, notamment dans le développement de la fibrose. La réponse inflammatoire observée après irradiation rassemble l'ensemble des éléments exogènes propices à l'initiation de l'EndoMT. Ainsi, l'EndoMT représente un candidat idéal dans le développement de la fibrose intestinale radio-induite.



## Problématique & Objectifs

La toxicité digestive radio-induite a longtemps été laissée de côté par l'ensemble du corps médical. Néanmoins, l'augmentation significative du nombre de patients concernés par ces séquelles digestives radio-induites a forcé une prise de conscience quant à la réalité de ces effets secondaires. En ce sens, les dommages radio-induits à l'intestin sont aujourd'hui identifiés comme étant une pathologie à part entière et sont regroupés sous le terme de « Pelvic Radiation Disease ». Parmi les tissus particulièrement vulnérables lors d'un traitement par radiothérapie, le rectum est considéré comme un OAR dans le traitement du cancer de la prostate. L'irradiation du rectum génère un ensemble de symptômes liés à la mise en place d'une réponse inflammatoire puis cicatricielle appelée la rectite radique. Parmi les mécanismes cellulaires impliqués dans la réponse aux rayonnements ionisants, l'endothélium vasculaire occupe une place centrale dans l'évolution de cette pathologie. C'est dans ce contexte que s'orientent les recherches du Laboratoire de Recherche en Radiobiologie et Radiopathologie (L3R), qui considère que les événements vasculaires précoces sont déterminants dans le devenir tissulaire et la qualité de la cicatrisation après irradiation. Dans ce contexte, l'EndoMT est apparue être un processus de choix dans l'initiation et le développement de la rectite radique pour plusieurs raisons : (i) tout d'abord, la séquence d'événements impliqués dans l'activation endothéliale radio-induite est aujourd'hui bien connue ; (ii) l'irradiation induit la mise en place d'une réponse inflammatoire aiguë et chronique propice à l'EndoMT ; (iii) la fibrose radique fait partie des lésions chroniques observées au long terme. Tout autant d'arguments qui laissaient penser que l'EndoMT pouvait jouer dans le développement de la rectite radique.

Ainsi les objectifs de cette étude se sont concentrés sur trois axes principaux. **Dans un premier temps, démontrer l'existence de l'EndoMT radio-induite *in vivo* chez la souris, puis de caractériser ce processus *in vitro* à partir de CE macro (HUVECs) et microvasculaires (HIMECs). Enfin, le dernier objectif de ce travail a consisté à décrypter les mécanismes moléculaires mis en jeu via une approche *in vitro*.**

## Résultats

### **Article 1 : Identification de l'EndoMT comme acteur potentiel dans le développement de la rectite radique**

*Travaux publiés en premier auteur dans « The American Journal of Pathology », Septembre 2015*

#### **Objectifs :**

Les cellules endothéliales possèdent une plasticité cellulaire remarquable leur permettant de moduler leur profil protéique et de se transdifférencier en cellules mésenchymateuses faisant référence au processus de transition endothélium-mésenchyme (EndoMT). En réponse à des signaux exogènes ou à un stress, les CE perdent l'expression de marqueurs caractéristiques tels que le CD31, le facteur von Willebrand (vWF), la VE-cadhérine et expriment des protéines mésenchymateuses, l' $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) et la smooth muscle 22  $\alpha$  (SM22 $\alpha$ ). Bien que l'EndoMT ait été initialement identifiée dans un contexte physiologique au cours de l'embryogenèse, il existe une accumulation de preuves cette dernière décennie permettant de relier ce phénomène avec le développement de pathologies avec une prédominance pour les fibroses. Ainsi, l'irradiation des tissus sains favorise la mise en place d'une réponse inflammatoire, dont la non-cicatrisation ou la cicatrisation pathologique des tissus peuvent conduire au développement d'une fibrose digestive radio-induite. La rectite radique chronique se développe chez 5 à 10 % des patients traités par radiothérapie pour tumeur prostatique en particulier. Parmi les mécanismes cellulaires impliqués dans cette cicatrisation pathologique, l'activation de l'endothélium vasculaire joue un rôle prépondérant dans l'initiation et la perduration du processus fibrotique. De récents travaux ont permis de mettre en évidence l'existence de l'EndoMT dans un contexte de maladies inflammatoires chroniques du tube digestif chez des patients atteints de maladie de Crohn et de Rectocolite hémorragique. Cependant, aucune étude n'a à ce jour révélé si l'EndoMT pouvait prendre part au développement de la fibrose intestinale radio-induite.

## **Résultats :**

L'irradiation de CE microvasculaires intestinales humaines (HIMECs) nous a permis de mettre en évidence le processus d'EndoMT 7 jours après une exposition à 10 Gy. Ce changement phénotypique est caractérisé par une activation endothéliale via la réorganisation du cytosquelette et des fibres d'actine (fibres de stress) après irradiation. Au niveau moléculaire, l'analyse de l'expression de 46 gènes a révélé une diminution globale des marqueurs endothéliaux (vWF, VE-cadhérine) et une augmentation de l'expression de marqueurs mésenchymateux dont l' $\alpha$ -SMA et la SM22 $\alpha$ . L'analyse de l'expression protéique de ces marqueurs par immunofluorescence a révélé que certaines cellules présentaient une réduction du marquage vWF et une augmentation concomitante de l'immunoréactivité de l' $\alpha$ -SMA après une exposition à 10 Gy. Chez l'homme, des co-marquages vWF/ $\alpha$ -SMA effectués sur des coupes de rectum de patients 5 à 7 semaines après radiothérapie, ont mis en évidence la présence de cellules double-positives au sein des vaisseaux. L'établissement d'un score lésionnel a permis de révéler que l'EndoMT était présente dans les tissus les plus lésés associée avec un important infiltrat inflammatoire. *In vivo*, l'identification de l'EndoMT s'est basée sur l'utilisation d'un modèle préclinique de rectite radique chez des souris Tie2-GFP, dans lequel le gène reporteur de la protéine fluorescente verte (GFP) est exprimé sous le contrôle du promoteur endothélial Tie2. Les résultats obtenus à l'aide de ce modèle ont montré la présence de l'EndoMT dès 7 jours après une irradiation colorectale à une dose unique de 27 Gy. Nos résultats ont révélé que la fréquence de ce phénomène est maximale 14 jours après exposition. Ces observations sont soutenues par une augmentation de l'immunoréactivité de l' $\alpha$ -SMA observée dès 14 jours avec une persistance accrue jusqu'à 14 semaines après l'irradiation des animaux. Au niveau moléculaire, nous avons pu noter une augmentation de la phosphorylation de Smad 2/3 au sein des tissus lésés correspondant à une activation de la voie TGF- $\beta$ , voie bien connue pour prendre part à l'initiation de l'EndoMT dans de nombreux contextes pathologiques.

## **Conclusions :**

Cette étude démontre que l'irradiation induit un changement phénotypique des HIMECs vers l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux-like, empreinte caractéristique du processus d'EndoMT. *In vitro*, la caractérisation de l'EndoMT radio-induite a permis de montrer une diminution de l'expression génique et protéique du vWF et l'acquisition de l'expression de

l' $\alpha$ -SMA et de la SM22 $\alpha$  7 jours après une irradiation de 10 Gy. Ces travaux révèlent pour la première fois l'existence de l'EndoMT chez l'homme après traitement par radiothérapie. *In vivo*, l'utilisation du modèle de souris Tie2-GFP a permis d'identifier l'EndoMT dans les vaisseaux muqueux et sous-muqueux dans un modèle préclinique de rectite radique. L'ensemble de ces résultats valide donc notre hypothèse de départ quant au possible rôle de l'EndoMT dans l'initiation et le développement de la fibrose fréquemment observée dans un contexte de rectite radique chez l'homme après radiothérapie pelvienne.

Official Journal of the American Society for Investigative Pathology

[ajp.amjpathol.org](http://ajp.amjpathol.org)

# The American Journal of PATHOLOGY

Cellular and Molecular Biology of Disease

September 2015 // Volume 185 // Number 9

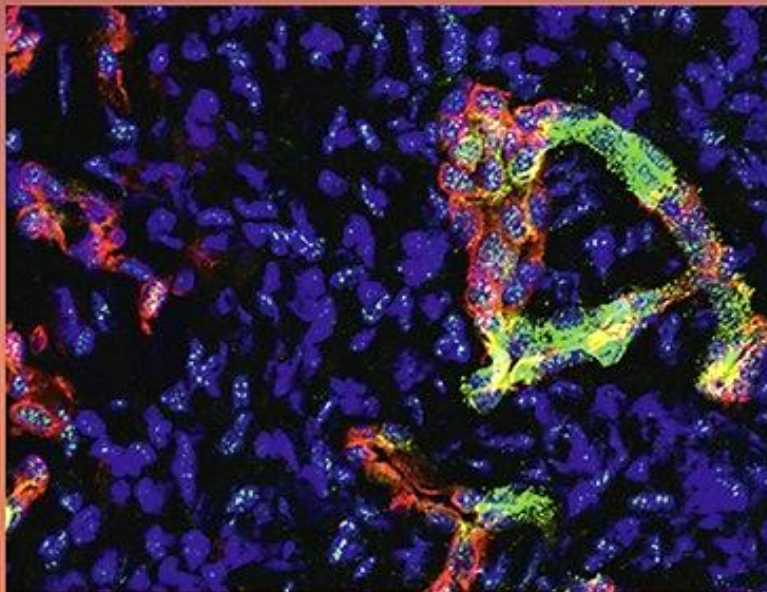
Inside:

**Short Communication** - Novel *CARD11* Mutations in Human Cutaneous Squamous Cell Carcinoma Lead to Aberrant NF- $\kappa$ B Regulation

Specific Lipopolysaccharide Serotypes Induce Differential Maternal and Neonatal Inflammatory Responses in a Murine Model of Preterm Labor

Astrocyte Activation via Stat3 Signaling Determines the Balance of Oligodendrocyte versus Schwann Cell Remyelination

Structural and Functional Alterations of Skeletal Muscle Microvasculature in Dystrophin-Deficient *mdx* Mice



Autophagy Links Ductular Reaction and Cirrhosis





## VASCULAR BIOLOGY, ATHEROSCLEROSIS, AND ENDOTHELIUM BIOLOGY

# Identification of Endothelial-to-Mesenchymal Transition as a Potential Participant in Radiation Proctitis



Elodie Mintet,\* Emilie Rannou,\* Valérie Buard,\* Gail West,<sup>†</sup> Olivier Guipaud,\* Georges Tarlet,\* Jean-Christophe Sabourin,<sup>‡</sup> Marc Benderitter,<sup>§</sup> Claudio Fiocchi,<sup>†</sup> Fabien Milliat,\* and Agnès François\*

From the Department of Radiobiology and Epidemiology,\* Radiobiology and Radiopathology Research Laboratory, and the Department of Radiobiology and Epidemiology,<sup>§</sup> Institut de Radioprotection et de Sécurité Nucléaire, Fontenay-aux-Roses, France; the Department of Pathobiology,<sup>†</sup> Digestive Disease Institute, Lerner Research Institute, Cleveland Clinic Foundation, Cleveland, Ohio; and the Department of Pathology,<sup>‡</sup> Rouen University Hospital, Rouen, France

Accepted for publication  
April 29, 2015.

Address correspondence to  
Agnès François, Ph.D., Institute  
for Radiological Protection and  
Nuclear Safety, Department of  
Radiobiology and Epidemiology,  
Radiobiology and Radiopathology  
Research Laboratory,  
31 Ave de la Division Leclerc,  
92265 Fontenay-aux-Roses,  
France. E-mail: agnes.  
francois@irsn.fr.

The endothelial-to-mesenchymal transition (EndoMT) is a crucial cellular process during heart development necessary to the formation of cardiac valves. This embryonic process reappears in several pathological situations, such as vascular injury or organ fibrosis of various etiologies, as a mediator of extracellular matrix-producing cells. Because radiation induces both vascular damage and fibrosis, we investigated whether radiation exposure induces EndoMT in primary human intestinal microvascular endothelial cells (HIMECs) and whether EndoMT contributes to radiation-induced rectal damage in humans and in a preclinical model of radiation proctitis in mice. Irradiated HIMECs show phenotypic hallmarks of radiation-induced endothelial cell activation *in vitro*. Moreover, HIMECs undergo changes in molecular expression pattern compatible with EndoMT, with up-regulation of mesenchymal markers and down-regulation of endothelial markers via transforming growth factor/Smad pathway activation. *In vivo*, EndoMT readily occurs in the human rectum after radiation therapy for rectal adenocarcinoma. Finally, EndoMT was observed in rectal mucosal and submucosal microvessels in a preclinical model of radiation proctitis in Tie2-green fluorescent protein reporter-expressing mice all along radiation proctitis development, also associated with transforming growth factor/Smad pathway activation. In conclusion, radiation-induced cell activation and tissue inflammation constitute a setting that fosters the phenotypic conversion of endothelial cells into mesenchymal cells. Therefore, EndoMT is identified as a potential participant in radiation-induced gut damage and may represent an interesting therapeutic target in cases of radiation-induced pelvic disease. (*Am J Pathol* 2015, 185: 2550–2562; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.04.028>)

Endothelial cells display a plastic behavior and undergo what is referred to as the endothelial-to-mesenchymal transition (EndoMT).<sup>1</sup> Similar to the epithelial-to-mesenchymal transition, EndoMT is characterized by the progressive phenotypic transition of endothelial cells to a fibroblast/myofibroblast or smooth muscle cell-like phenotype. EndoMT is reflected by the loss of specific endothelial cell markers (vascular endothelial cadherin and platelet endothelial cell adhesion molecule-1) and the *de novo* expression of several mesenchymal cell markers, such as  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA), a marker of myofibroblastic activation, or smooth muscle 22  $\alpha$ , which is specifically expressed by smooth muscle cells, together with the loss of cell-cell

junctions and the acquisition of invasive and migratory properties. EndoMT is a common physiological process occurring during embryogenesis, such as cardiac development.<sup>2,3</sup> In adult tissues, EndoMT occurs in pathological conditions, such as cardiac, renal, or pulmonary fibrosis.<sup>3–5</sup> A recent study identified endothelium as the origin, via EndoMT, of neointimal hyperplasia responsible for graft failure after coronary bypass surgery in humans.<sup>6</sup> EndoMT is also responsible for a significant fraction of ectopic ossifying

Supported by the Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety ROSIRIS Program.

Disclosures: None declared.

lesions in cases of fibrodysplasia ossificans progressiva, a genetic disorder characterized by ectopic bone formation and ossification of soft tissues.<sup>7</sup> Finally, EndoMT participates in tumor progression as an inducer of carcinoma-associated fibroblasts.<sup>8</sup>

Radiation proctitis is a common and debilitating consequence of radiation therapy for pelvic tumors, such as rectal and prostatic carcinoma, and radiation-induced gastrointestinal toxicity remains a limiting factor in the application of radiation therapy. Radiation-induced damage to the gastrointestinal tissue is characterized by acute inflammation, followed by progressive tissue scarring leading to organ fibrosis.<sup>9,10</sup> Vascular abnormalities in irradiated tissue have been observed in patients undergoing radiotherapy for cancer, and endothelial injury has been described as a crucial event in the initiation and progression of tissue damage.<sup>10,11</sup> Long-term endothelial cell activation induced by irradiation favors the maintenance of a procoagulant phenotype and immune cell recruitment, both of which may participate in chronic fibrosis.<sup>12</sup> Tissue fibrosis is characterized by sustained production and deposition of extracellular matrix by activated mesenchymal cells, primarily myofibroblasts, resulting in tissue remodeling, which may compromise organ function.<sup>13</sup> The origins of myofibroblasts in tissue fibrosis are multiple.<sup>14</sup> Resident mesenchymal cells, such as fibroblasts or smooth muscle cells, respond to the inflammatory insult by switching to a myofibroblastic phenotype, acquiring  $\alpha$ -SMA—positive stress fibers and secreting fibrillar collagens; hematopoietic mesenchymal progenitors may be recruited from the bloodstream<sup>15</sup>; and cells of non-mesenchymal origin, such as epithelial and endothelial cells, may transform into mesenchymal or smooth muscle—like cells and participate in organ fibrosis.<sup>16,17</sup> Although EndoMT has been demonstrated in several organs, such as the injured heart, lung, and kidney, less is known concerning the gut, and especially radiation-induced damage to the gastrointestinal tract. A first study demonstrated an epithelial-to-mesenchymal transition in the pathogenesis of fistulae in human Crohn disease, and more recently an epithelial-to-mesenchymal transition was identified in a preclinical model of trinitrobenzene sulfonic acid—induced intestinal fibrosis in mice.<sup>18,19</sup> Finally, Rieder et al<sup>20</sup> detected, for the first time, EndoMT in inflamed human intestinal mucosa and in a preclinical model of colonic fibrosis in mice. EndoMT is governed by several signaling pathways, among which include transforming growth factor (TGF)- $\beta$ 1 and its canonical Smad2/3 signaling cascade, and TGF- $\beta$ 2 signaling through the Smad, mitogen-activated protein kinase/extracellular-signal regulated kinase, phosphatidylinositol 3-kinase, and P38 mitogen-activated protein kinase pathways.<sup>6,21–23</sup> TGF- $\beta$  is, by the way, used as a potent inducer of EndoMT both *in vitro* and *in vivo*.<sup>4,8</sup> We previously published that radiation-induced vascular damage in human radiation proctitis and irradiated endothelial cells *in vitro* show overexpression of TGF- $\beta$  and phospho-Smad2/3, conditions that may favor EndoMT.<sup>24,25</sup>

Given the fact that EndoMT has never been reported in irradiated gut and considering that intestinal fibrosis of various etiologies may share common mechanisms, we

assumed that EndoMT could participate in the development of radiation-induced intestinal fibrosis.

Herein, we show that irradiated human intestinal microvascular endothelial cells (HIMECs) acquire a mesenchymal-like phenotype suggestive of radiation-induced EndoMT *in vitro* via TGF/Smad pathway activation. EndoMT also occurs in human radiation proctitis. *In vivo*, there is evidence of EndoMT in the rectal mucosal and submucosal vessels using a preclinical model of radiation proctitis in Tie2—green fluorescent protein (GFP) reporter-expressing mice, from day 7 to 14 weeks after irradiation, associated also with TGF/Smad pathway activation. These data suggest that radiation-induced damage to the healthy rectum may cause phenotypic conversion of endothelial cells into a mesenchymal-like phenotype, which may participate in tissue injury, and reinforce the key role of the microvasculature in the development of radiation damage to gastrointestinal tissue.

## Materials and Methods

### Cell Culture

HIMECs were isolated from surgically resected specimens of normal human colon, as previously described.<sup>26</sup> Cells were grown in EBM-2MV (Lonza, Verviers, Belgium) and subcultured in 6-well plates. Confluent HIMEC monolayers were exposed to 0, 2, 10, or 20 Gy  $\gamma$  irradiation with a <sup>137</sup>Cs source (IBL 637; CisBio, Saclay, France; dose rate, 1 Gy/minute). Normal intestinal myofibroblasts (Lonza) were cultured in SmGM-2 medium (Lonza).

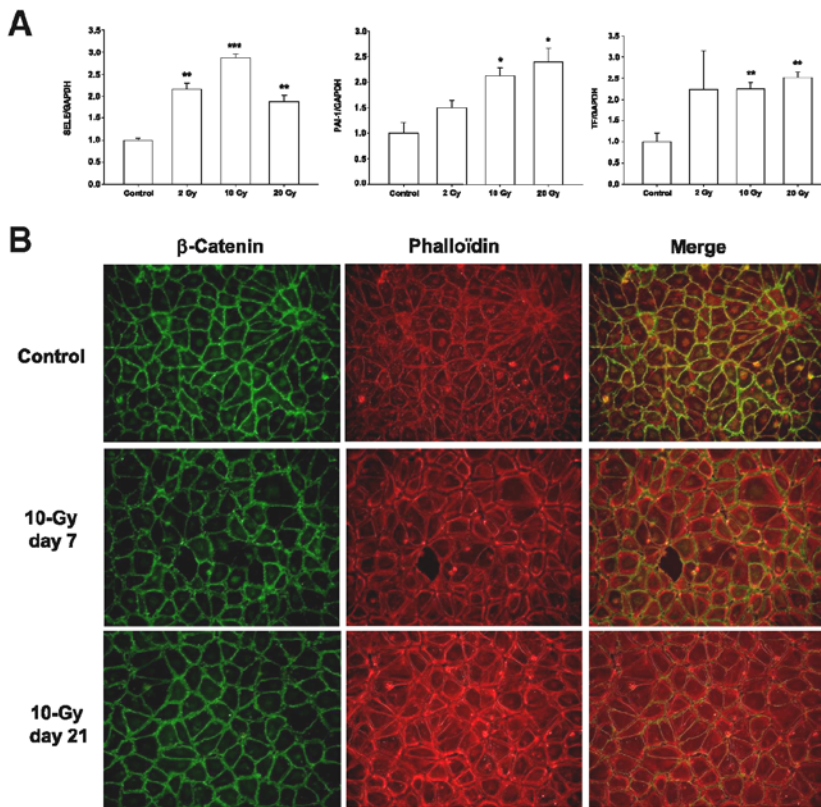
For immunofluorescence, cells were incubated with polyclonal rabbit anti-human von Willebrand factor (vWF; Dako, Les Ulis, France), mouse monoclonal anti-human  $\alpha$ -SMA clone 1A4 (Dako), goat polyclonal anti-human smooth muscle 22- $\alpha$  (Abcam, Paris, France), or rabbit polyclonal anti-phospho-Smad2/3 (Ser423/Ser425; Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), followed by corresponding secondary antibodies (Alexa Fluor—conjugated antibodies; Life Technologies, Saint Aubin, France). For double immunostaining, primary antibodies were incubated together, and corresponding secondary antibodies too. Slides were mounted in Vectashield mounting medium with DAPI (Eurobio/Abcys, Courtaboeuf, France).

$\beta$ -Catenin/phalloidin co-immunostaining: cells were incubated with primary rabbit monoclonal anti- $\beta$ -catenin antibody (Abcam), followed by corresponding secondary antibody (Alexa Fluor—conjugated antibody; Life Technologies). A CytoPainter F-actin staining kit, red fluorescence (Abcam), was used, according to the manufacturer's instructions, to stain phalloidin. Slides were mounted in Vectashield mounting medium without DAPI (Eurobio/Abcys).

### Human Rectal Tissue

Human rectal tissue was obtained at the Department of Pathology, Gustave Roussy Institute (Villejuif, France), following institutional ethical guidelines and French Medical Research





**Figure 1** Human intestinal microvascular endothelial cells (HIMECs) are activated by ionizing radiation. **A:** Real-time quantitative PCR analyses of HIMEC expression of E-selectin (SELE), plasminogen activator inhibitor-type 1 (PAI-1), and tissue factor (TF) 7 days after 0-, 2-, 10-, or 20-Gy radiation exposure, showing classic radiation-induced endothelial cell activation. **B:** Double-immunofluorescence staining of control and 10-Gy-irradiated HIMECs 7 and 21 days after exposure with human anti- $\beta$ -catenin antibody (green) and F-actin cytopainting kit using phalloidin conjugate (red). Merged images are presented in the right column. Radiation exposure induces a global increase in cellular stress fibers. Data are representative of three independent experiments performed in triplicate (**A**). Data are presented as means  $\pm$  SEM (**A**). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , and \*\*\* $P < 0.001$ . Original magnification,  $\times 200$  (**B**). GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

Council guidelines. Tissue specimens from 24 patients treated for rectal adenocarcinoma with preoperative radiotherapy (45 Gy; fractions of 1.8 or 2 Gy) were included. Tumors were surgically resected 5 to 7 weeks after treatment. For each patient, specimens of normal tissue were taken adjacent to the tumor (in the irradiation field) and distant from the tumor (outside the irradiation field), making each patient his or her own control.<sup>25</sup> Paraffin-embedded rectal sections (5  $\mu$ m thick) were stained with hematoxylin/eosin/saffron for routine examination. Radiation injury scores were determined independently by two authors (A.F. and F.M.), and discrepancies were resolved in conference. Briefly, individual abnormalities in each tissue compartment were assessed as normal or abnormal, ranked according to severity, as described in [Supplemental Table S1](#). The sum of the scores for each parameter in all compartments (the retrieved sum to 100) constituted the radiation injury score.

For immunofluorescence double labeling, sections were incubated with monoclonal mouse anti-human smooth muscle  $\alpha$ , clone 1A4 (Dako), and polyclonal rabbit anti-human vWF (Dako) at the same time, followed by corresponding secondary Alexa Fluor-conjugated antibodies (Life Technologies). Sections were mounted in Vectashield mounting medium with DAPI (Eurobio/Abcys).

#### Animal Model and Irradiation

The protocol (P13 to P18) for animal use in this project was reviewed and approved by the national ethics committee 81.

Tg(TIE2GFP)287Sato/J mice (TIE2-GFP mice) expressing the green fluorescent protein under the control of endothelial promoter Tie2 were from the Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME). Animals were anesthetized (1.5% isoflurane), and a single dose of 27-Gy  $\gamma$  irradiation (1.4 Gy/minute) was delivered by a cobalt 60 source through a  $1 \times 0.8$ -cm window centered on the colorectal region. This model of localized single-dose radiation exposure does not simulate fractionation treatment, but generates histopathological lesions similar to those seen clinically (ie, severe acute mucosal ulceration and transmural collagen deposition during the late phase), with 100% rectal obstruction, as previously reported.<sup>27–29</sup>

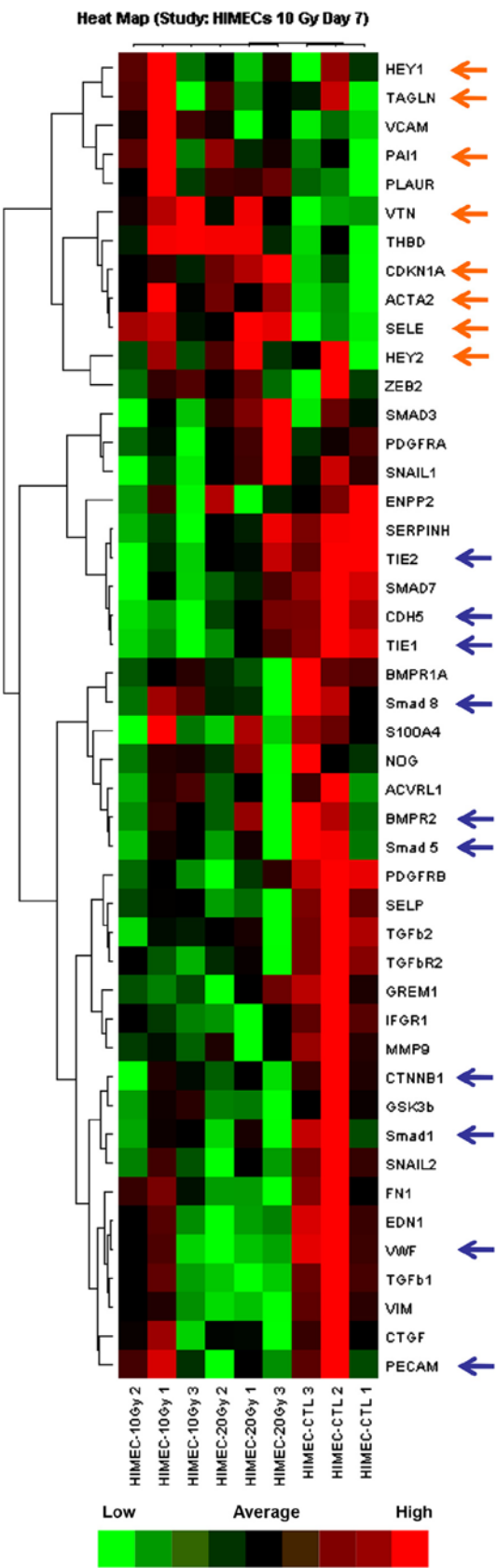
At different times after radiation exposure, colorectal tissues were removed and paraffin sections (5  $\mu$ m thick) were stained with hematoxylin-eosin-saffron for routine histological examination.

#### GFP Immunostaining

Sections were incubated with goat polyclonal to GFP primary antibody (Abcam), followed by a biotinylated rabbit anti-goat IgG secondary antibody (Dako), and counterstained with Mayer's hematoxylin.

#### Immunofluorescence

Sections were incubated with a rabbit anti- $\alpha$ -SMA primary antibody (Abcam), followed by an Alexa Fluor 488-conjugated



goat anti-mouse antibody (Life Technologies). For GFP and  $\alpha$ -SMA or phospho-Smad2/3 double-immunofluorescence staining, sections were incubated with rabbit polyclonal antibody to  $\alpha$ -SMA (Abcam) or to phospho-Smad2/3 (Santa Cruz Biotechnology), followed by Alexa Fluor 568—conjugated goat anti-rabbit antibody, and with goat polyclonal antibody to GFP/fluorescein isothiocyanate (Abcam). Sections were mounted in ProLong Gold Antifade Mountant with DAPI (Life Technologies). Confocal analyses were performed on a Zeiss LSM 780 confocal imaging system (Zeiss France, Marly le Roi, France).

### Chimeric Mice

TIE2-GFP mice were prepared with 9.5 Gy total body irradiation, followed by i.v. injection of wild-type bone marrow 24 hours after irradiation. Eight weeks after wild-type bone marrow grafting, TIE2-GFP recipient mice were exposed to 27-Gy colorectal irradiation. Tissues were collected 7 days after exposure to look for GFP-positive cells.

### Real-Time Quantitative PCR

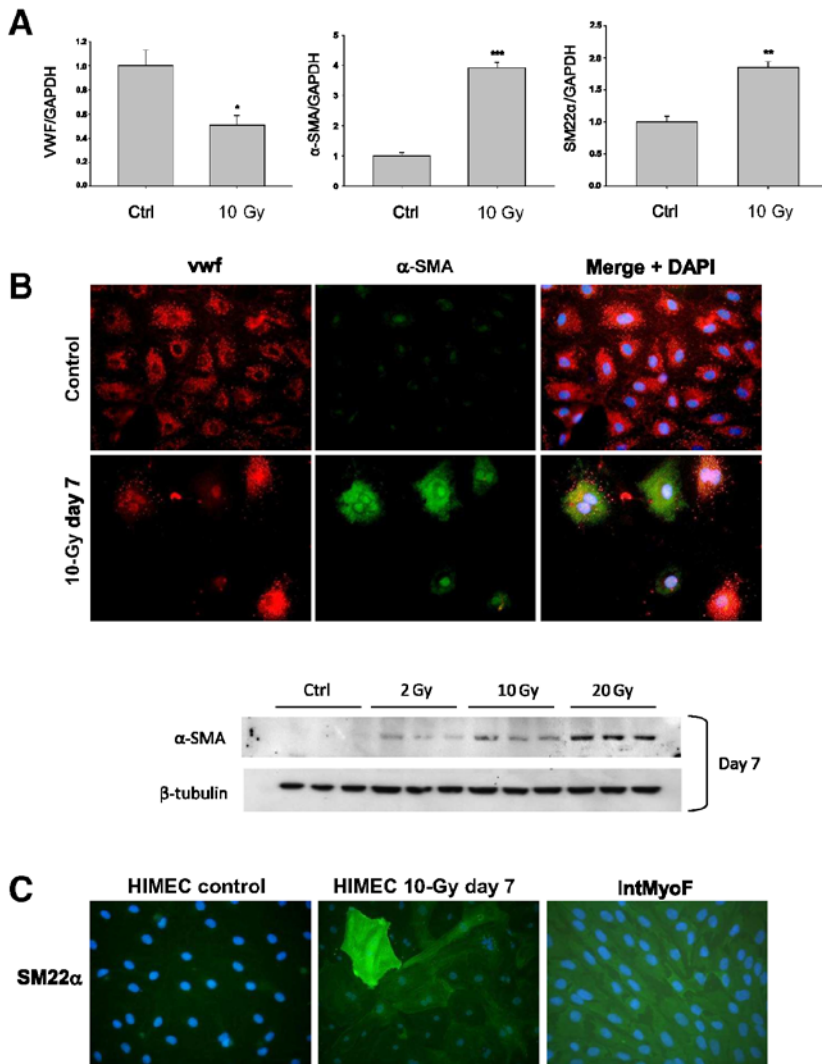
Mouse colorectal tissues were frozen in RNeasy RNA stabilization reagent (Qiagen, Valencia, CA) until analysis. Tissue and cell total RNA was prepared with the total RNA isolation kit RNeasy Mini Kit (Qiagen). After quantification on a NanoDrop ND-1000 apparatus (NanoDrop Technologies, Rockland, DE), reverse transcription was performed with 1  $\mu$ g RNA using a reverse transcription kit from Applied Biosystems (Courtaboeuf, France). Real-time quantitative PCR was performed on a 7900HT Fast-Real Time PCR system (Applied Biosystems) using predeveloped TaqMan Gene Expression assays (Applied Biosystems), with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase for cells and 18S for tissues as housekeeping genes. Relative mRNA was quantified using the  $\Delta\Delta C_T$  method. DataAssist software version 3.01 (Life Technologies) was used to perform hierarchical clustering with global normalization and Pearson's correlation.

### Western Blot Procedures

Cell total protein was extracted using radioimmunoprecipitation assay buffer supplemented with phosphatase and protease inhibitors (Roche Diagnostics, Meylan, France). Protein concentration was determined using a BCA assay (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), and equal amounts of protein were resolved by SDS-PAGE. The blocked membrane was incubated with

**Figure 2** Irradiated human intestinal microvascular endothelial cells (HIMECs) show modifications in gene expression pattern resembling endothelial-to-mesenchymal transition *in vitro*. Assay heat map illustrating differentially expressed genes among 46 genes measured 7 days after exposure of HIMECs to 0-, 10-, or 20-Gy irradiation. For one gene considered, red represents high expression, and green represents low expression. **Blue arrows** indicate decreased expression of endothelial markers in irradiated HIMECs compared with controls, and **orange arrows** indicate increased expression of markers of radiation-induced endothelial activation and mesenchymal markers. Data are representative of three independent experiments performed in triplicate.





**Figure 3** Irradiated human intestinal microvascular endothelial cells (HIMECs) show a mesenchymal-like phenotype *in vitro*. **A**: Real-time quantitative PCR analyses showing decreased von Willebrand factor (VWF) and increased  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) and transgelin (smooth muscle 22  $\alpha$ ) expression in 10-Gy-irradiated HIMECs compared with controls (Ctrl) 7 days after exposure. Data are representative of three independent experiments performed in triplicate. **B**: Immunofluorescence images showing double labeling of VWF and  $\alpha$ -SMA in control and 10-Gy-irradiated HIMECs 7 days after exposure, highlighting phenotypic changes observed during the endothelial-to-mesenchymal transition (EndoMT) process. Increased  $\alpha$ -SMA mRNA expression was confirmed by Western blot analysis at day 7 for 2, 10, and 20 Gy. **C**: Immunofluorescence images illustrating the radiation-induced EndoMT process with *de novo* expression of smooth muscle 22  $\alpha$  in 10-Gy-irradiated HIMECs 7 days after exposure, compared with constitutive expression in intestinal myofibroblasts (IntMyoFs). Nuclei were counterstained with DAPI. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , and \*\*\* $P < 0.001$ . Original magnification,  $\times 400$  (**B** and **C**). GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

primary antibodies overnight at 4°C. Bands were detected by using a horseradish peroxidase secondary antibody and visualized with ECL Plus reagent (GE Healthcare, Buc, France).  $\beta$ -Tubulin or glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase was used as loading control (Santa Cruz Biotechnology).

### Statistical Analysis

Data are given as means  $\pm$  SEM. Statistical analyses were performed by analysis of variance, *t*-test, or Mann-Whitney rank sum test when appropriate, with a level of significance of  $P < 0.05$ .

### Results

#### Irradiation Modulates HIMECs to a Mesenchymal-Like Phenotype *in Vitro* via TGF/Smad Pathway Activation

The purity and endothelial nature of HIMECs were verified by repeated flow cytometric sorting, real-time quantitative PCR,

immunostaining, and the Dil-Ac-LDL (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI) incorporation test until 20 passages, as described by Rieder et al.<sup>20</sup> HIMECs in the present study were used between passages 11 and 15.

To induce EndoMT, confluent HIMECs were exposed to single doses of 0-, 2-, 10-, and 20-Gy irradiation and monitored until day 21 after exposure. Irradiated HIMECs acquired some features of radiation-induced endothelial cell activation observed in other cell lines, such as increased expression of plasminogen activator inhibitor-type 1, tissue factor, and E-selectin (Figure 1A), together with a radiation-induced global increase in stress fibers, as illustrated by phalloidin staining (Figure 1B). Irradiated HIMECs also showed gene expression modifications compatible with EndoMT. Heat map representation with 46 genes measured 7 days after exposure of HIMECs to 0, 10, or 20 Gy discriminated between unirradiated cells and 10- or 20-Gy-irradiated cells (Figure 2). Radiation exposure decreases expression by HIMECs of endothelial cell markers, such as vascular endothelial

cadherin (CDH5), CD31 (platelet endothelial cell adhesion molecule), vWF,  $\beta$ -catenin (CTNNB1), Tie1, and Tie2. Decreased expression of endothelial cell markers occurs with a concurrent increase in actor mediators of EndoMT, such as HEY1 and HEY2 (Figure 2), and in mesenchymal cell markers, such as  $\alpha$ -SMA (ACTA2) and smooth muscle 22  $\alpha$  (Figures 2 and 3A). Immunofluorescence double staining of vWF and  $\alpha$ -SMA in control and irradiated HIMECs showed that within the irradiated cell population, some cells lose vWF and concurrently show increased  $\alpha$ -SMA immunoreactivity, whereas other cells maintain vWF immunoreactivity (Figure 3B). This may suggest that radiation-induced EndoMT does not affect all irradiated HIMECs or that phenotypic changes may occur at different time points, at least *in vitro*. Increased  $\alpha$ -SMA expression was confirmed at the protein level by Western blot analysis and is shown for the day 7 time point (Figure 3B). Radiation-induced EndoMT is also illustrated by immunofluorescence staining for smooth muscle 22  $\alpha$ . Smooth muscle 22  $\alpha$  immunoreactivity was absent in control HIMECs, whereas there was a global increase in the entire irradiated cell population, with some cells showing strongly positive cable-shaped immunoreactivity (Figure 3C).

Transformed HIMECs showed no change in Smad3 mRNA and protein levels (Figure 4, A and B), but Western blot and immunostaining studies revealed that irradiated HIMECs have increased phospho-Smad2/3 protein levels (Figure 4, B and C), suggesting activation of the canonical TGF/Smad pathway during the EndoMT process.

The conversion of endothelial cells into mesenchymal cells may involve the passage through a multipotent stem-like phenotype, as demonstrated by Medici et al.<sup>7</sup> We, therefore, measured the expression of several hematopoietic stem and progenitor cells (CD34, vascular endothelial growth factor receptor 2, and CD133) and stem cell markers (CD10, CD44, CD71, CD90, and CD117). CD133, CD10, and CD90 expression was not detected under the mentioned conditions. Only CD34 expression significantly increased after radiation exposure (Supplemental Figure S1).

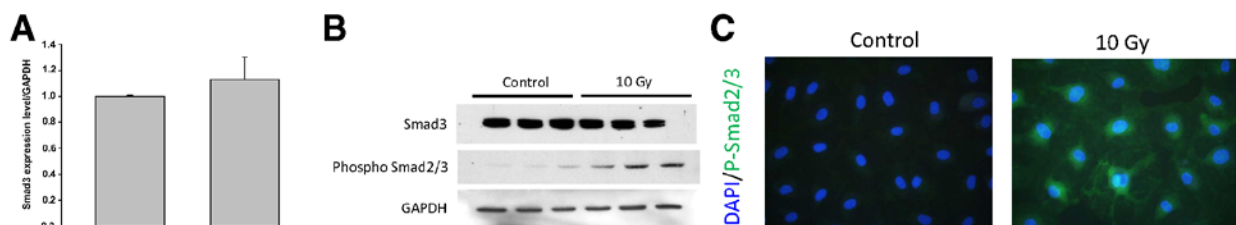
### EndoMT Occurs in Human Radiation Proctitis

EndoMT has been reported in colonic Crohn disease and ulcerative colitis human tissues, in mucosal vessels in close

proximity to inflammatory infiltrates. EndoMT was visualized by immunofluorescence and double labeling of both an endothelial marker (vWF) and a mesenchymal marker ( $\alpha$ -SMA).<sup>20</sup> At 5 to 7 weeks after the end of radiation therapy, radiation proctitis is characterized by mucosal and submucosal inflammation and collagen deposition,<sup>25,29</sup> a pathological context known to favor EndoMT. Moreover, a previous study showed increased endothelial phospho-Smad2/3 immunostaining in cases of human radiation proctitis,<sup>25</sup> suggesting radiation-induced activation of the canonical TGF/Smad pathway recognized as an EndoMT inducer. Colocalization of vWF and  $\alpha$ -SMA was observed in mucosal and submucosal vessels of human radiation proctitis, but not in normal rectal tissue (Figure 5A), suggesting that EndoMT may participate in tissue damage after radiation exposure. Figure 5B shows the percentage of patients showing EndoMT according to tissue radiation injury score (Supplemental Table S1). To further explore EndoMT *in vivo*, we used a preclinical model of radiation proctitis in transgenic mice.

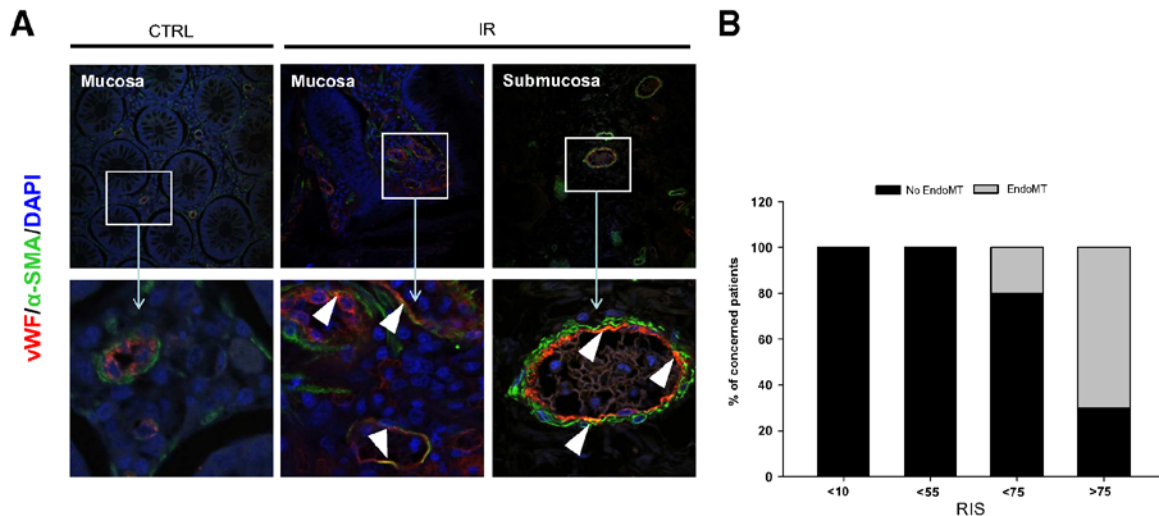
### Evidence for EndoMT *in Vivo* in a Preclinical Model of Radiation Proctitis

EndoMT has been implicated in several models of tissue injury with common features of inflammation and fibrosis. The preclinical model of radiation proctitis used herein was characterized by severe acute inflammation progressing to subsequent tissue fibrosis, pathophysiological processes that may favor EndoMT. To monitor eventual radiation-induced loss of endogenous endothelial markers and allow the recognition of mesenchymal marker-expressing cells of endothelial origin, radiation proctitis was induced in endothelial reporter mice expressing GFP under the control of the endothelial-specific promoter Tie2. As previously described,<sup>29</sup> acute radiation proctitis (day 14) consisted of extensive mucosal ulceration with complete loss of crypt architecture and dense transmural inflammation (Figure 6). Late damage (14 weeks) was characterized by dystrophic mucosal regeneration with glandular atypia, including colitis cystica profunda, and matrix deposition, especially in the mucosal and submucosal compartments. The development of radiation proctitis was associated with a progressive



**Figure 4** Smad3 activation in human intestinal microvascular endothelial cells (HIMECs) 7 days after 10-Gy radiation exposure. **A:** HIMEC irradiation does not change Smad3 mRNA levels. **B:** Smad3 protein levels are unchanged after radiation exposure, but phospho-Smad2/3 increases. **C:** Radiation-induced increase in phospho-Smad2/3 protein levels are confirmed by immunofluorescence staining using anti-phospho-Smad2/3 antibody. Data are representative of three independent experiments. GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.





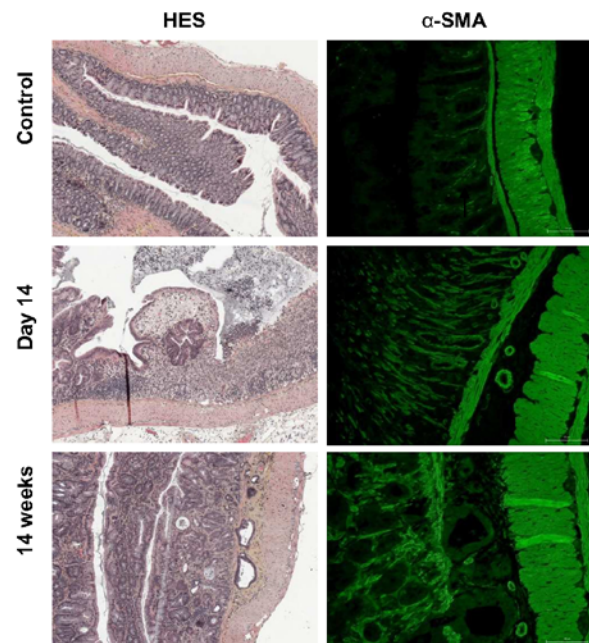
**Figure 5** Endothelial-to-mesenchymal transition (EndoMT) is present in irradiated (IR) human rectum. **A:** Immunofluorescence double labeling of von Willebrand factor (vWF; red) and  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA; green) in human rectal tissues 5 to 7 weeks after 45-Gy preoperative radiation therapy for rectal adenocarcinoma. Co-expression of vWF and  $\alpha$ -SMA (yellow) is observed in the chorionic mucosal microvessels and in the submucosal vessels of pathological tissues, but not in control (CTRL) tissues. Enlargements of boxed areas show co-expression indicated with arrowheads. Nuclei were counterstained with DAPI. **B:** Percentage of patients concerned with EndoMT according to the radiation injury score (RIS).  $n = 4$  (RIS, <10 and <55);  $n = 5$  (RIS, <75);  $n = 11$  (RIS, >75). Original magnification,  $\times 200$  (A).

increase in  $\alpha$ -SMA immunoreactivity (Figure 6).  $\alpha$ -SMA is expressed by smooth muscle cells, transiently expressed by fibroblast-derived myofibroblasts in wound healing conditions, and sustainably expressed in fibroproliferative diseases.<sup>30,31</sup> Thus, we investigated whether cells of endothelial origin (GFP positive) contribute to global  $\alpha$ -SMA expression in pathological tissue.

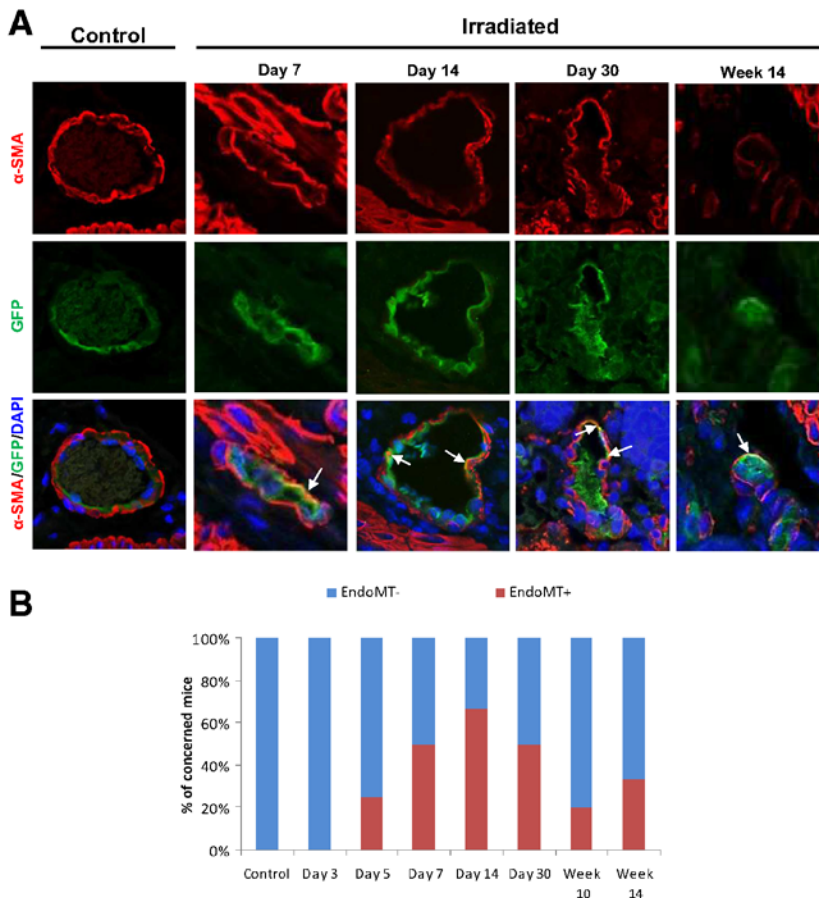
Radiation-induced mucosal damage was characterized by substantial infiltration of immune cells and by a dense microvascular network. Tie2 is considered as endothelial specific, but is also known to be expressed by a subset of myeloid cells.<sup>32</sup> The co-immunostaining of inflamed tissues with both anti-GFP antibody (for endothelial cells) and  $\alpha$ -SMA with corresponding fluorescent secondary antibodies (green for GFP and red for  $\alpha$ -SMA) showed numerous GFP-positive cells outside the vascular endothelium, which were difficult to identify as myeloid cells or capillary endothelial cells (Supplemental Figure S2A). To see if eventual Tie2-positive myeloid cells represent an obstacle to the assessment of GFP/ $\alpha$ -SMA staining, we grafted wild-type bone marrow in Tie2-GFP recipient mice to turn off bone marrow expression of Tie2 (and GFP). Tie2-GFP mice showed a pan-endothelial staining pattern of GFP lining the internal part of the blood vessels with sparse round GFP-positive cells mainly located in the mucosa, suggestive of immune cells (Supplemental Figure S2B). Acute inflammatory infiltrate in these mice showed a negligible participation of these round-shaped cells in the global radiation-induced infiltrate (Supplemental Figure S2B). Wild-type bone marrow grafting in Tie2-GFP mice did not change the staining pattern in control or in irradiated tissues, suggesting that GFP-positive immune cells may not compromise the monitoring of GFP-positive

endothelial cells during the development of tissue radiation damage.

To monitor the EndoMT process, endothelial cells expressing the mesenchymal marker  $\alpha$ -SMA were tracked



**Figure 6** Radiation proctitis in mice is associated with increased  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) immunoreactivity. Images of hemalun-eosin-safran (HES) and  $\alpha$ -SMA immunofluorescence staining of control and 27-Gy-irradiated tissues during the inflammatory (day 14) and fibrotic (14 weeks) phases showing severe acute transmural inflammation/mucosal ulceration and late mucosal atypia/transmural collagen deposition. Tissue damage progression is associated with a gradual increase in  $\alpha$ -SMA immunoreactivity. Original magnification,  $\times 100$  (left panels);  $\times 200$  (right panels).



**Figure 7** *In vivo* evidence of endothelial-to-mesenchymal transition (EndoMT) in the preclinical mouse model of radiation proctitis in mice expressing the green fluorescent protein (GFP) under the control of the endothelial promoter Tie2. **A:** Representative images of confocal microscopy of immunofluorescence double labeling of  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA; mesenchymal marker, red) and GFP (endothelial marker, green) in control and 27-Gy-irradiated mouse rectum 7, 14, and 30 days and 14 weeks after exposure.  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>/GFP<sup>+</sup> double-labeled cells (yellow, arrows) are observed in small vessels of the mucosa and submucosa of irradiated tissues whatever the time after irradiation. No double labeling was observed in control tissues. **B:** Percentage of control and 27-Gy-irradiated Tie2-GFP mice concerned with EndoMT from 3 days to 14 weeks after exposure.  $n = 3$  (control);  $n = 5$  (irradiated animals). Original magnification,  $\times 400$  (A).

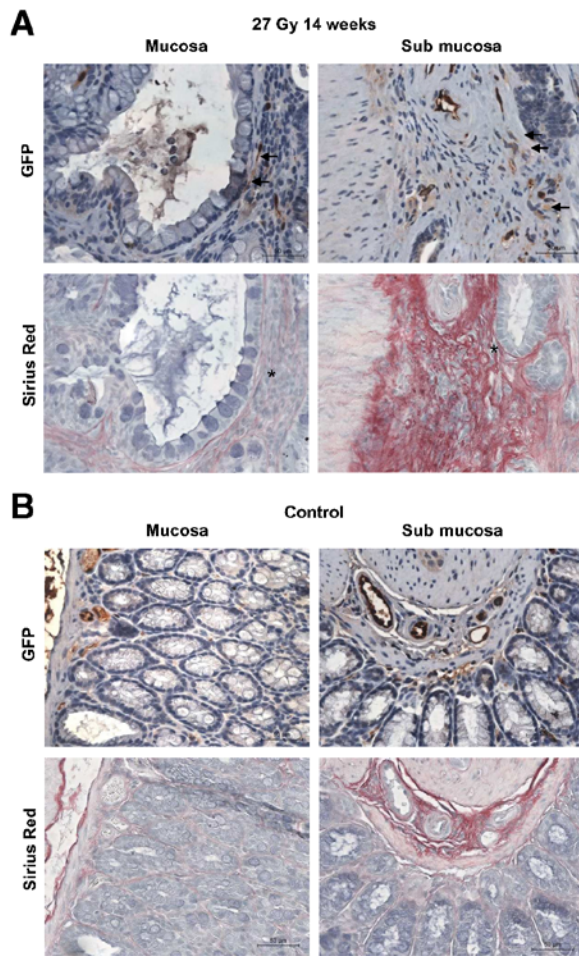
by double-immunofluorescence staining in control and irradiated tissues. Double-stained cells showed a yellow fluorescent signal, indicative of EndoMT. Images of GFP/ $\alpha$ -SMA co-expressing cells were noted at different times after exposure (7, 14, and 30 days or 14 weeks after irradiation), with higher frequency during the inflammatory phase (Figure 7). No double-stained cells were observed in corresponding control tissues. Co-expression of mesenchymal and endothelial markers has been demonstrated in the vascular endothelium, but also within fibrotic areas in different models of tissue damage. In our case, no signal was observed outside the endothelial lining of vessels. We assumed that Tie2 (and GFP) expression may be shut off on cell differentiation *in vivo* and may prevent the fluorescent signal, especially given the strong mesenchymal marker fluorescence intensity. GFP-positive cells were thus sought outside the endothelial compartment in areas of fibrosis by GFP immunostaining alone, and serial section staining with Sirius red to identify collagen deposition. Staining revealed the presence of elongated GFP-positive cells in areas of mucosal and submucosal fibrosis (Figure 8A), suggesting mesenchymal cells of endothelial origin and confirming the EndoMT process as a potential participant in the

development of rectal radiation fibrosis. No such GFP-positive elongated cells were observed in control tissues (Figure 8B).

#### EndoMT *in Vivo* Occurs Together with the Canonical TGF- $\beta$ /Smad Pathway Activation

In our preclinical model of radiation proctitis, rectal inflammation 14 days after radiation exposure was characterized by changes in mRNA expression levels of several factors recognized as EndoMT participants (Figure 9A). For example, inflammatory mediators, such as IL-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$ , are known to induce HIMEC EndoMT *in vitro*, and Snail and Zeb are EndoMT transcription factors. Moreover, irradiated tissues show increased expression of TGF- $\beta$ , able to induce EndoMT *in vitro*, and some TGF- $\beta$  target genes, such as *SERPINE1* (plasminogen activator inhibitor-type 1), *MMP2*, and *MMP9*. Irradiation also increases tissue expression of mesenchymal markers, such as  $\alpha$ -SMA, Col3A1, or smooth muscle 22  $\alpha$ , suggesting TGF/Smad pathway activation *in vivo*. To confirm TGF/Smad activation, fluorescent co-immunostainings of GFP and phospho-Smad2/3 were performed on irradiated tissues (Figure 9B). Images showed that radiation





**Figure 8** Presence of elongated green fluorescent protein (GFP)<sup>+</sup> cells outside the vascular endothelium. **A:** GFP immunostaining and Sirius red staining in 27-Gy-irradiated tissues showing mucosal and submucosal compartments. Elongated GFP<sup>+</sup> cells (arrows) are seen around dystrophic crypts in the mucosa in areas of collagen deposition revealed by Sirius red staining (asterisk). In the submucosa, areas of dense Sirius red staining (asterisk) show GFP<sup>+</sup> cells outside the vascular compartment, suggesting an endothelial origin (arrows). **B:** No elongated GFP<sup>+</sup> cells are observed in control tissues. Original magnification,  $\times 400$  (A and B).

exposure induced phospho-Smad2/3 immunoreactivity in numerous cells' nucleus, including endothelial cells. Data suggest canonical TGF $\beta$ /Smad pathway activation 14 days after radiation exposure, the time at which we observed a higher frequency of EndoMT.

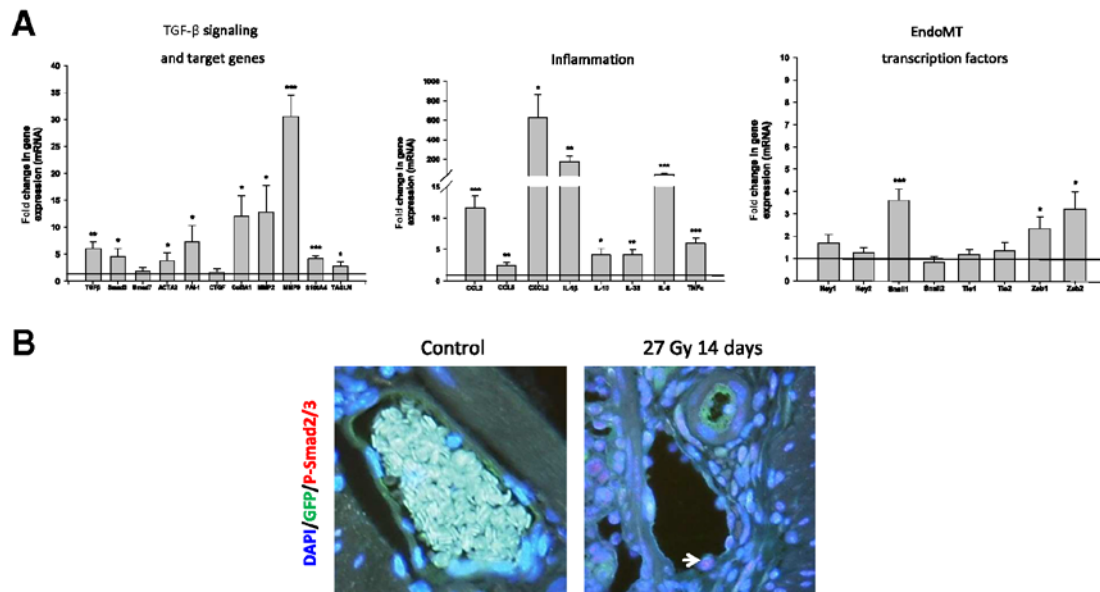
## Discussion

It is now well established that endothelial cells are the cornerstone of the initiation and development of radiation damage to healthy normal tissues.<sup>11,12</sup> Radiation-induced endothelial cell apoptosis and a long-lasting activated phenotype both favor vascular leakage, microvascular thrombosis, and immune cell recruitment.<sup>11</sup>

In this study, we demonstrated that irradiated HIMECs derived from normal human colonic mucosa show increased expression of endothelial cell activation markers, such as tissue factor, plasminogen activator inhibitor-type 1, or E-selectin, and increased stress fiber formation. Otterson et al<sup>33</sup> showed that irradiation of HIMECs induced cell apoptosis and stress fiber formation, decreased cell migration in a scratch injury model *in vitro*, and reduced *in vitro* tube-like structure formation. Protection from radiation effects by a superoxide dismutase mimetic reveals that irradiated HIMECs are subject to an oxidant microenvironment.<sup>33</sup> These features of endothelial cell oxidative stress, apoptosis, and global functional modifications after irradiation have been demonstrated in more common macrovascular and microvascular cell lines after radiation exposure.<sup>12,34,35</sup> The innovative concept in the present study was to determine whether radiation-induced phenotypic changes in HIMECs resemble EndoMT and whether this process participates in radiation-induced intestinal fibrosis. Several published findings were in favor of the possibility of inducing EndoMT by irradiating HIMECs. First, mediators of inflammation, TGF $\beta$  signaling, and oxidative stress, all features of cell response to radiation exposure, induce EndoMT in different cell lines.<sup>21–23</sup> Second, HIMECs undergo EndoMT when exposed to recombinant cytokines or *ex vivo* inflammatory mediators.<sup>20</sup> Frid et al<sup>36</sup> demonstrated, for the first time, that, as embryonic vasculature, adult bovine endothelial cells can acquire a smooth muscle phenotype *in vitro*. Interestingly, they used cell irradiation to stop cell proliferation. They thus demonstrated that EndoMT was independent of cell proliferation and still occurred in quiescent irradiated endothelial cells. Even though the authors did not specify whether irradiation increased the number of transdifferentiating cells, this was the first study to report EndoMT after irradiation. Kim et al<sup>37</sup> have shown that irradiation induces macrovascular endothelial cell transformation into a mesenchymal phenotype *in vitro* and that a proportion of the mesenchymal cells found in atherosclerotic tissues of irradiated apolipoprotein E-null mice were of endothelial origin. Radiation-induced EndoMT was confirmed in HIMECs in the present study. Irradiated HIMECs reduced their expression of several endothelial markers and showed *de novo* expression of mesenchymal markers, the hallmark of EndoMT. Irradiated HIMECs also showed reduced Tie1 expression, a deficiency that induces human dermal microvascular endothelial cells to undergo EndoMT.<sup>11</sup> Moreover, we showed that EndoMT was associated with increased phospho-Smad2/3 protein levels, suggesting involvement of the canonical TGF $\beta$ /Smad pathway in radiation-induced EndoMT *in vitro* in our model. This was already demonstrated in other experimental conditions inducing EndoMT but also in models of epithelial-to-mesenchymal transition.<sup>6,23,38</sup>

The conversion of endothelial cells into mesenchymal cells may involve the passage through a multipotent stem-like





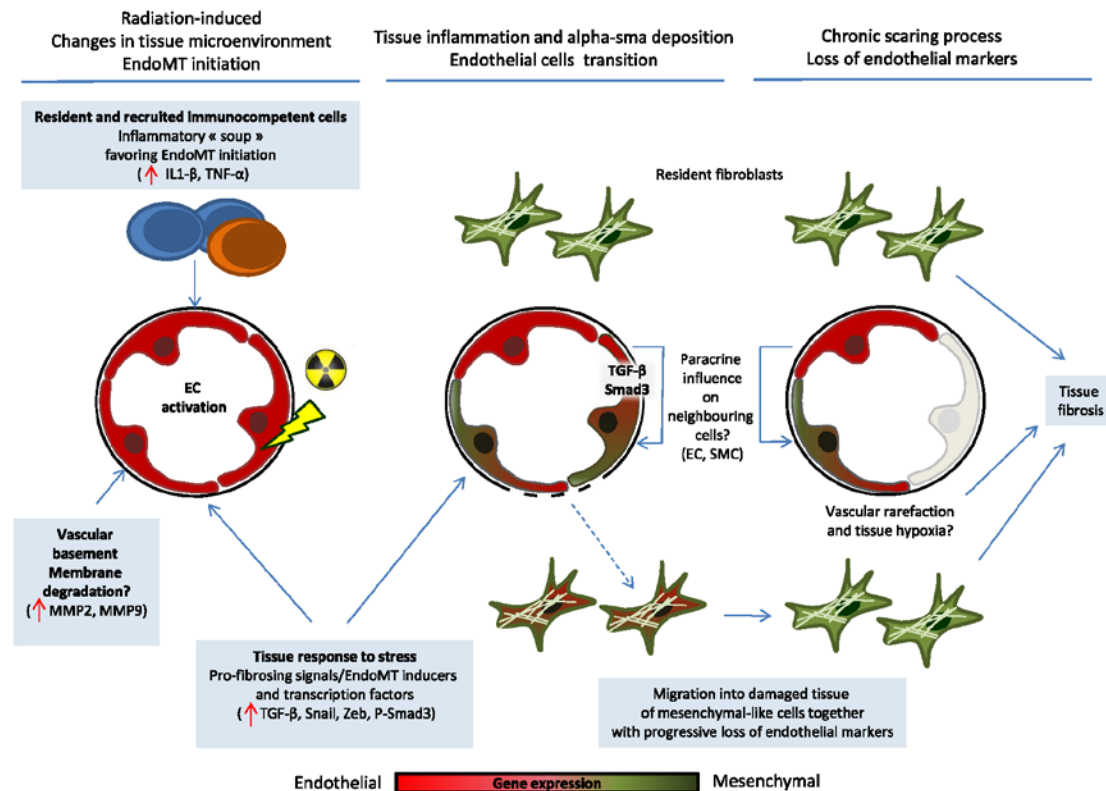
**Figure 9** Endothelial-to-mesenchymal transition (EndoMT) *in vivo* occurs together with the canonical TGF/Smad pathway activation. **A:** Fold changes in gene expression in 27-Gy-irradiated rectal tissues 14 days after exposure, the time at which the higher frequency of EndoMT was observed. PCR analyses showed an increase in TGF- $\beta$ 1, Smad 3, and TGF- $\beta$  target genes, several inflammatory mediators known as EndoMT inducers [IL-1 $\beta$  and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ ], and EndoMT-related transcription factors. **B:** Immunofluorescence images of double labeling of GFP and phospho-Smad2/3 in control and 27-Gy-irradiated rectum, 14 days after exposure. Immunostaining shows radiation-induced nuclear localization of phospho-Smad2/3 in numerous cell types, including endothelial cells (arrow).  $n = 5$  (control);  $n = 6$  (irradiated animals). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , and \*\*\* $P < 0.001$ . Original magnification,  $\times 400$  (B). CCL, chemokine ligand; CTGF, connective tissue growth factor; MMP, matrix metalloproteinase; PAI, plasminogen activator inhibitor.

phenotype.<sup>7,39</sup> Irradiated HIMECs did not show significant variations in expression of mesenchymal stem cell markers. Concerning hematopoietic stem cell and progenitor cell markers, only CD34 expression increased after exposure of HIMECs to radiation. CD34 is regarded as a marker of vascular endothelial progenitor cells in the peripheral blood, but has numerous other biological functions.<sup>40,41</sup> Primary human umbilical vein endothelial cells *in vitro* are CD34 positive and gradually lose CD34 expression during passages and cell maturation. The remaining CD34-positive cells represent a subpopulation of elongated cells with specific adhesion and migration properties resembling sprouting tip cells during *in vivo* angiogenesis.<sup>42,43</sup> CD34 tends to be considered as the guardian of cell plasticity, and CD34 overexpression may favor EndoMT and transformed cell mobility. This remains to be studied.

HIMECs are primary isolated cells from normal human colon and thus represent a highly relevant model to investigate whether EndoMT occurs and participates in the excessive scarring process in human irradiated gut. We show, for the first time, that EndoMT exists in human rectum 5 to 7 weeks after 45-Gy preoperative radiation therapy for rectal adenocarcinoma. Transforming endothelial cells lose their endothelial markers, thus compromising observation of mesenchymal cells of endothelial origin in human irradiated tissue. To investigate the reality of radiation-induced EndoMT *in vivo* and to have access to multiple time points in the development of radiation-induced tissue damage, we

used a model of radiation proctitis in endothelial cell reporter mice. In this model, GFP-expressing endothelial cells can be monitored throughout their transformation.<sup>4,20,23</sup> Areas of radiation-induced rectal inflammation and fibrosis show EndoMT in the vascular endothelium of mucosal and submucosal vessels. EndoMT occurred in a proinflammatory mediators overexpression context of several mediators (IL-1 $\beta$ , tumor necrosis factor- $\alpha$ , and TGF- $\beta$ ) known to induce EndoMT *in vitro*.<sup>20</sup> EndoMT-related transcription factors, concurrent with the overexpression of several TGF- $\beta$  target genes, and associated with phospho-Smad2/3 immunoreactivity in endothelial cells' nuclei. Data suggest that EndoMT readily exists in our preclinical model of radiation-induced proctitis and may occur via the TGF/Smad pathway activation, as demonstrated *in vitro*.

However, and in contrast to several studies showing mesenchymal cells of endothelial origin outside the vascular compartment in models of lung, kidney, or intestinal fibrosis,<sup>20,44,45</sup> we did not observe signals outside the endothelial compartment after double-immunofluorescence staining. It is possible that Tie2 (and GFP) expression was shut off or even reduced on cell differentiation *in vivo* in our model, and became invisible given the strong fluorescent signal obtained for  $\alpha$ -SMA. We thus performed GFP immunostaining alone on tissue sections presenting areas of fibrosis (highlighted by Sirius red staining). We then observed some GFP-positive spindle-shaped cells in those areas, suggesting mesenchymal cells of endothelial origin



**Figure 10** Radiation-induced endothelial-to-mesenchymal transition (EndoMT). Radiation-induced changes in tissue microenvironment favor EndoMT by the activation of resident cells and/or recruitment of different cell types, resulting in the overexpression of molecular factors known as EndoMT inducers or EndoMT transcription factors, or implicated in the basement membrane degradation necessary to cell movement during transition. Perduring tissue inflammation maintains tissue stress and allows endothelial cell (EC) transition via transforming growth factor (TGF)- $\beta$ /Smad pathway activation. Transformed ECs may stay in the vascular compartment and exert paracrine influence on neighboring cells. ECs can also move within the tissue while progressively losing their endothelial markers, and participate in the scarring process together with other mesenchymal cells. SMC, smooth muscle cell.

possibly participating in radiation-induced tissue fibrosis. It is, however, currently impossible to estimate the percentage of mesenchymal cells of endothelial origin, because we still do not know if transforming cells completely lose their vascular features or if they remain intermediate cells.

Tie2-GFP mice are widely used to track endothelial cells, and the Tie2 promoter is used specifically to turn off genes in the endothelial compartment. However, the specificity of Tie2 promoter may be challenged. Indeed, not only endothelial cells but also some hematopoietic stem cells, pericyte precursors (spindle-shaped cells around tumor vessels), and a fraction of tumor-infiltrating leukocytes have been identified as pro-angiogenic Tie2-expressing monocytes.<sup>46</sup> Herein, highly GFP-positive cells observed outside the endothelial compartment in control tissues were sparse and round, so probably not pericytes. We turned off hematopoietic progenitor Tie2 expression by wild-type bone marrow grafting in Tie2-GFP recipient mice. This did not change the few nonendothelial GFP-positive round cells in unirradiated and in irradiated tissue, suggesting negligible participation of GFP-positive cells of bone marrow origin in radiation-induced inflammatory infiltrate. This strengthens our observations of the endothelial origin of mesenchymal-like low-GFP spindle-shaped cells in areas of

collagen deposition in damaged rectum. Nevertheless, the presence of GFP-positive mesenchymal cells of endothelial origin outside the vascular endothelium seems not to be a prerequisite for EndoMT to participate in tissue fibrosis, because transformed endothelial cells may influence surrounding cells, such as vascular smooth muscle cells or pericytes, through a paracrine action and favor tissue fibrosis.<sup>25</sup>

In conclusion, we report herein that EndoMT readily occurs in cases of human radiation proctitis after external beam radiation therapy. *In vivo* radiation-induced EndoMT is found again in a preclinical model of radiation proctitis in mice, and *in vitro* on isolated human microvascular endothelial cells, both via, at least in part, the activation of the canonical TGF/ $\beta$ /Smad pathway. Figure 10 shows a schematic representation of the events that may occur in irradiated healthy tissue and favor EndoMT, and the possible consequences of endothelial cells' phenotypic conversion. As demonstrated in more and more diseases, such as tumor progression, multiple forms of tissue inflammation or fibrosis, and even rare diseases (eg, fibrodysplasia ossificans progressiva), EndoMT may contribute to radiation-induced healthy intestinal tissue damage and may, once precise mechanisms are deciphered, represent an interesting therapeutic target in cases of pelvic radiation disease.

## Supplemental Data

Supplemental material for this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajpath.2015.04.028>.

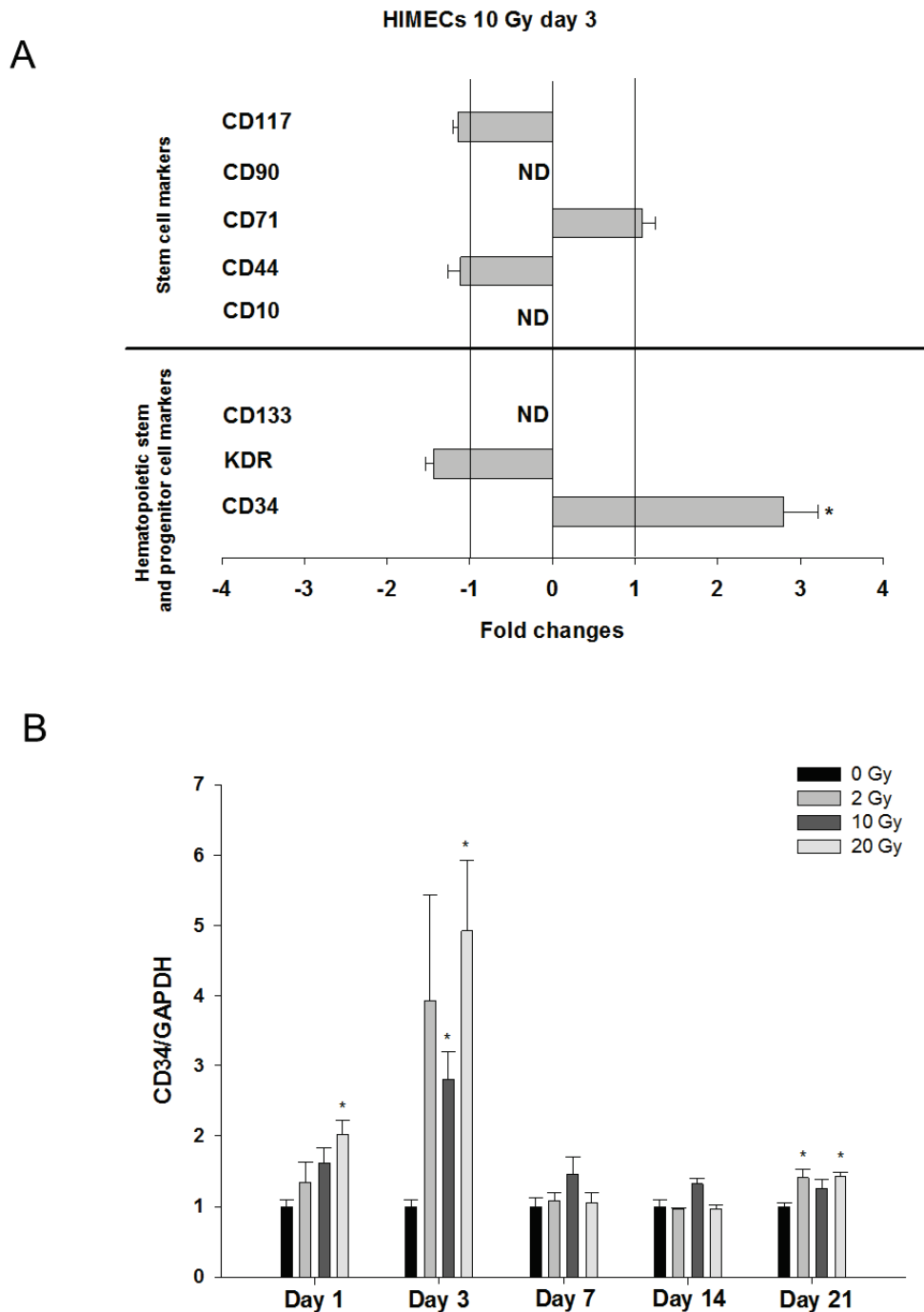
## References

- van Meeteren LA, ten Dijke P: Regulation of endothelial cell plasticity by TGF-beta. *Cell Tissue Res* 2012, 347:177–186
- Liebner S, Cattellino A, Gallini R, Rudini N, Iurlaro M, Piccolo S, Dejana E: Beta-catenin is required for endothelial-mesenchymal transformation during heart cushion development in the mouse. *J Cell Biol* 2004, 166:359–367
- Arciniegas E, Frid MG, Douglas IS, Stenmark KR: Perspectives on endothelial-to-mesenchymal transition: potential contribution to vascular remodeling in chronic pulmonary hypertension. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007, 293:L1–L8
- Zeisberg EM, Tarnavsky O, Zeisberg M, Dorfman AL, McMullen JR, Gustafsson E, Chandraker A, Yuan X, Pu WT, Roberts AB, Neilson EG, Sayegh MH, Izumo S, Kalluri R: Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med* 2007, 13:952–961
- He J, Xu Y, Koya D, Kanasaki K: Role of the endothelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis of chronic kidney disease. *Clin Exp Nephrol* 2013, 17:488–497
- Cooley BC, Nevado J, Mellad J, Yang D, St Hilaire C, Negro A, Fang F, Chen G, San H, Walts AD, Schwartzbeck RL, Taylor B, Lanzer JD, Wragg A, Elagha A, Beltran LE, Berry C, Feil R, Virmani R, Ladich E, Kovacic JC, Boehm M: TGF-beta signaling mediates endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT) during vein graft remodeling. *Sci Transl Med* 2014, 6:227ra234
- Medici D, Shore EM, Lounev VY, Kaplan FS, Kalluri R, Olsen BR: Conversion of vascular endothelial cells into multipotent stem-like cells. *Nat Med* 2010, 16:1400–1406
- Zeisberg EM, Potenta S, Xie L, Zeisberg M, Kalluri R: Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts. *Cancer Res* 2007, 67:10123–10128
- Denham JW, Hauer-Jensen M: The radiotherapeutic injury: a complex “wound.” *Radiother Oncol* 2002, 63:129–145
- Bentzen SM: Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: radiobiology meets molecular pathology. *Nat Rev Cancer* 2006, 6:702–713
- Wang J, Boerma M, Fu Q, Hauer-Jensen M: Significance of endothelial dysfunction in the pathogenesis of early and delayed radiation enteropathy. *World J Gastroenterol* 2007, 13:3047–3055
- Milliat F, Francois A, Tamarat R, Benderitter M: [Role of endothelium in radiation-induced normal tissue damages] *French. Ann Cardiol Angeiol (Paris)* 2008, 57:139–148
- Yarnold J, Brotons MC: Pathogenetic mechanisms in radiation fibrosis. *Radiother Oncol* 2010, 97:149–161
- Hinz B, Phan SH, Thannickal VJ, Galli A, Bochaton-Piallat ML, Gabbiani G: The myofibroblast: one function, multiple origins. *Am J Pathol* 2007, 170:1807–1816
- Mattoli S, Bellini A, Schmidt M: The role of a human hematopoietic mesenchymal progenitor in wound healing and fibrotic diseases and implications for therapy. *Curr Stem Cell Res Ther* 2009, 4:266–280
- Kalluri R, Neilson EG: Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* 2003, 112:1776–1784
- Piera-Velazquez S, Li Z, Jimenez SA: Role of endothelial-mesenchymal transition (EndoMT) in the pathogenesis of fibrotic disorders. *Am J Pathol* 2011, 179:1074–1080
- Bataille F, Rohmeier C, Bates R, Weber A, Rieder F, Brenmoehl J, Strauch U, Farkas S, Furst A, Hofstadter F, Scholmerich J, Herfarth H, Rogler G: Evidence for a role of epithelial mesenchymal transition during pathogenesis of fistulae in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis* 2008, 14:1514–1527
- Flier SN, Tanjore H, Kokkotou EG, Sugimoto H, Zeisberg M, Kalluri R: Identification of epithelial to mesenchymal transition as a novel source of fibroblasts in intestinal fibrosis. *J Biol Chem* 2010, 285:20202–20212
- Rieder F, Kessler SP, West GA, Bhilocha S, de la Motte C, Sadler TM, Gopalan B, Stylianou E, Fiocchi C: Inflammation-induced endothelial-to-mesenchymal transition: a novel mechanism of intestinal fibrosis. *Am J Pathol* 2011, 179:2660–2673
- Medici D, Potenta S, Kalluri R: Transforming growth factor-beta2 promotes Snail-mediated endothelial-mesenchymal transition through convergence of Smad-dependent and Smad-independent signalling. *Biochem J* 2011, 437:515–520
- Maleszewska M, Moonen JR, Huijckman N, van de Sluis B, Krenning G, Harmsen MC: IL-1beta and TGFbeta2 synergistically induce endothelial to mesenchymal transition in an NFkappaB-dependent manner. *Immunobiology* 2013, 218:443–454
- Montorfano I, Becerra A, Cerro R, Echeverria C, Saez E, Morales MG, Fernandez R, Cabello-Verrugio C, Simon F: Oxidative stress mediates the conversion of endothelial cells into myofibroblasts via a TGF-beta1 and TGF-beta2-dependent pathway. *Lab Invest* 2014, 94:1068–1082
- Milliat F, Sabourin JC, Tarlet G, Holler V, Deutsch E, Buard V, Tamarat R, Atfi A, Benderitter M, Francois A: Essential role of plasminogen activator inhibitor type-1 in radiation enteropathy. *Am J Pathol* 2008, 172:691–701
- Milliat F, Francois A, Isoir M, Deutsch E, Tamarat R, Tarlet G, Atfi A, Validire P, Bourhis J, Sabourin JC, Benderitter M: Influence of endothelial cells on vascular smooth muscle cells phenotype after irradiation: implication in radiation-induced vascular damages. *Am J Pathol* 2006, 169:1484–1495
- Binion DG, West GA, Ina K, Ziats NP, Emancipator SN, Fiocchi C: Enhanced leukocyte binding by intestinal microvascular endothelial cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1997, 112:1895–1907
- Skwarchuk MW, Travis EL: Volume effects and epithelial regeneration in irradiated mouse colorectum. *Radiat Res* 1998, 149:1–10
- Skwarchuk MW, Travis EL: Changes in histology and fibrogenic cytokines in irradiated colorectum of two murine strains. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1998, 42:169–178
- Blirando K, Milliat F, Martelly I, Sabourin JC, Benderitter M, Francois A: Mast cells are an essential component of human radiation proctitis and contribute to experimental colorectal damage in mice. *Am J Pathol* 2011, 178:640–651
- Darby I, Skalli O, Gabbiani G: Alpha-smooth muscle actin is transiently expressed by myofibroblasts during experimental wound healing. *Lab Invest* 1990, 63:21–29
- Nedelec B, Ghahary A, Scott PG, Tredget EE: Control of wound contraction: basic and clinical features. *Hand Clin* 2000, 16:289–302
- De Palma M, Venneri MA, Roca C, Naldini L: Targeting exogenous genes to tumor angiogenesis by transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells. *Nat Med* 2003, 9:789–795
- Otterson MF, Nie L, Schmidt JL, Link BJ, Jovanovic N, Lyros O, Rafiee P: EUK-207 protects human intestinal microvascular endothelial cells (HIMEC) against irradiation-induced apoptosis through the Bcl2 pathway. *Life Sci* 2012, 91:771–782
- Blirando K, Hneino M, Martelly I, Benderitter M, Milliat F, Francois A: Mast cells and ionizing radiation induce a synergistic expression of inflammatory genes in endothelial cells by a mechanism involving p38alpha MAP kinase and (p65) NF-kappaB activation. *Radiat Res* 2012, 178:556–567
- Soloviev AI, Tishkin SM, Parshikov AV, Ivanova IV, Goncharov EV, Gurney AM: Mechanisms of endothelial dysfunction after ionized radiation: selective impairment of the nitric oxide component of endothelium-dependent vasodilation. *Br J Pharmacol* 2003, 138:837–844
- Frid MG, Kale VA, Stenmark KR: Mature vascular endothelium can give rise to smooth muscle cells via endothelial-mesenchymal trans-differentiation: in vitro analysis. *Circ Res* 2002, 90:1189–1196

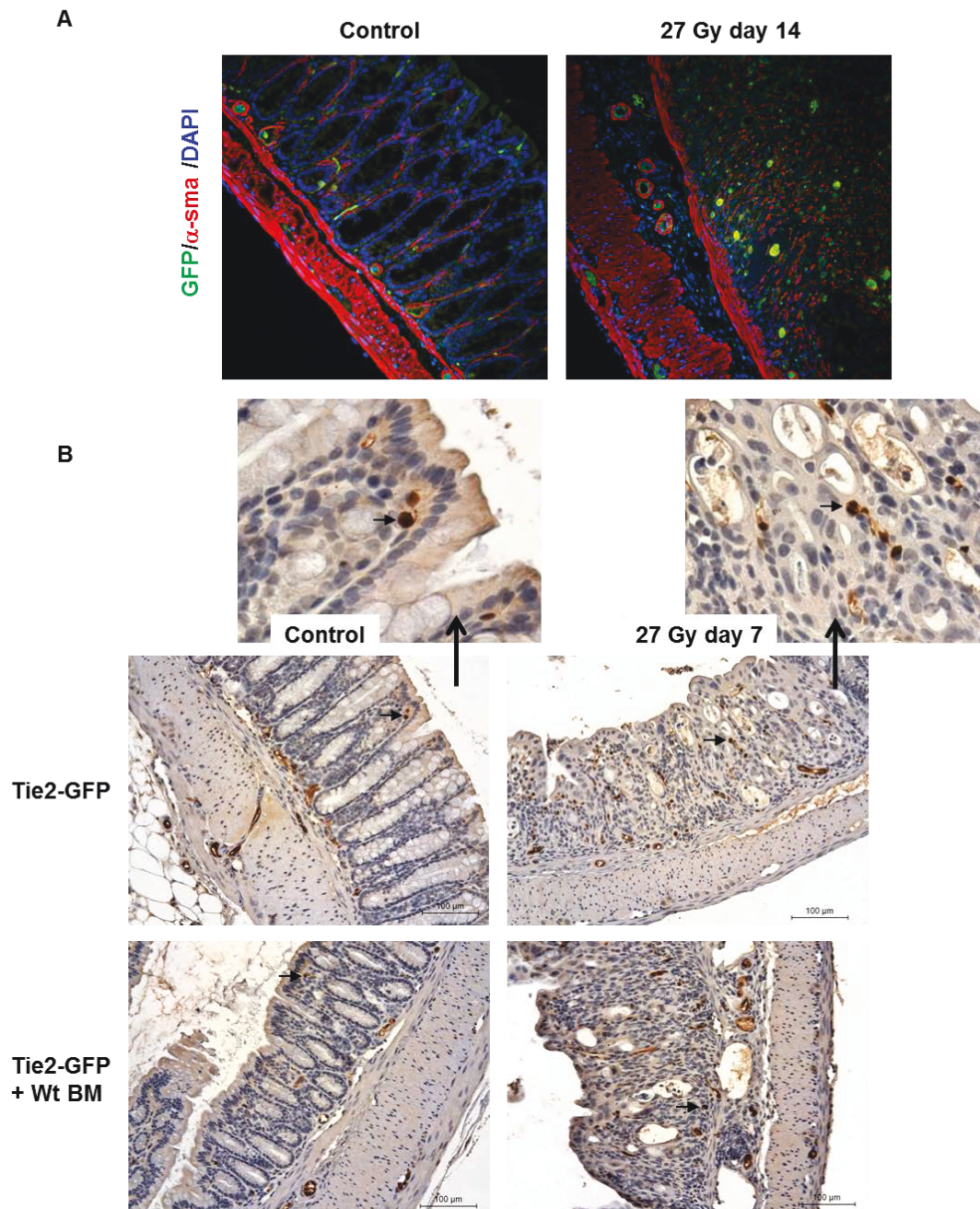


Mintet et al

37. Kim M, Choi SH, Jin YB, Lee HJ, Ji YH, Kim J, Lee YS, Lee YJ: The effect of oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) on radiation-induced endothelial-to-mesenchymal transition. *Int J Radiat Biol* 2013, 89:356–363
38. Corallino S, Malabarba MG, Zobel M, Di Fiore PP, Scita G: Epithelial-to-mesenchymal plasticity harnesses endocytic circuitries. *Front Oncol* 2015, 5:45
39. Medici D, Kalluri R: Endothelial-mesenchymal transition and its contribution to the emergence of stem cell phenotype. *Semin Cancer Biol* 2012, 22:379–384
40. Sidney LE, Branch MJ, Dunphy SE, Dua HS, Hopkinson A: Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors. *Stem Cells* 2014, 32:1380–1389
41. Nielsen JS, McNagny KM: Novel functions of the CD34 family. *J Cell Sci* 2008, 121:3683–3692
42. Siemerink MJ, Klaassen I, Vogels IM, Griffioen AW, Van Noorden CJ, Schlingemann RO: CD34 marks angiogenic tip cells in human vascular endothelial cell cultures. *Angiogenesis* 2012, 15: 151–163
43. Delia D, Lampugnani MG, Resnati M, Dejana E, Aiello A, Fontanella E, Soligo D, Pierotti MA, Greaves MF: CD34 expression is regulated reciprocally with adhesion molecules in vascular endothelial cells in vitro. *Blood* 1993, 81:1001–1008
44. Hashimoto N, Phan SH, Imaizumi K, Matsuo M, Nakashima H, Kawabe T, Shimokata K, Hasegawa Y: Endothelial-mesenchymal transition in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2010, 43:161–172
45. LeBleu VS, Taduri G, O'Connell J, Teng Y, Cooke VG, Woda C, Sugimoto H, Kalluri R: Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis. *Nat Med* 2013, 19:1047–1053
46. De Palma M, Venneri MA, Galli R, Sergi L, Politi LS, Sampaoli M, Naldini L: Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors. *Cancer Cell* 2005, 8:211–226



**Supplemental Figure 1:** HIMECs expression of stem cells markers. A: fold changes in expression level of several stem cell and hematopoietic stem and progenitor markers. Data are representative of 2 experiments realized in triplicates and presented as means  $\pm$  sem. \* $p < 0.05$ . B: CD34 mRNA expression in HIMECs at 1, 3, 7, 14 and 21 days post-exposure to 0, 2, 10 or 20 Gy irradiation. Data are representative of 2 experiments realized in triplicates and presented as means  $\pm$  sem. \* $p < 0.05$ .



**Supplemental Figure 2:** Non-endothelial Tie2-positive cells in inflamed tissues. A: Immunofluorescence images showing double labeling of GFP and alpha-sma in control and 27 Gy-irradiated tissues, showing extensive GFP<sup>+</sup> staining in the inflamed area. Original magnification x 200. Nuclei are counterstained with DAPI. B: Control and irradiated tissues immunostained for GFP and counterstained with hemalun in native Tie2-GFP mice and Tie2-GFP mice grafted with wild-type bone marrow. Only sparse, round non-endothelial GFP<sup>+</sup> cells are visible even in inflamed tissues (arrows), suggesting negligible participation of bone marrow-derived GFP<sup>+</sup> myeloid cells in global GFP immunoreactivity. Original magnification x 200.

<b>Mucosa</b>	Normal : 0 Moderately abnormal with slight inflammation : 1 Markedly abnormal with strong inflammation: 2 Severely abnormal with severe inflammation and loss of epithelium (ulceration): 3
<b>Muscularis Mucosa</b>	Normal: 0 Markedly abnormal with slight matrix deposition and/or slight dystrophy: 1 Severely abnormal with strong matrix deposition and/or severe dystrophy: 2
<b>Submucosa</b>	Normal: 0 Moderately abnormal with inflammation: 1 Moderately abnormal with oedema: 2 Markedly abnormal with slight matrix deposition: 3 Severely abnormal with fibrosis: 3
<b>Submucosal vessels</b>	Normal: 0 Markedly abnormal with slight matrix deposition and/or slight dystrophy: 1 Severely abnormal with strong matrix deposition and/or severe dystrophy: 2
<b>Muscularis Propria</b>	Normal: 0 Markedly abnormal with slight matrix deposition and/or dystrophy: 1 Severely abnormal with strong matrix deposition and/or dystrophy: 2
<b>Mesentery</b>	Normal: 0 Markedly abnormal with slight matrix deposition: 1 Severely abnormal with fibrosis: 2
<b>Mesenteric vessels</b>	Normal: 0 Markedly abnormal with slight matrix deposition and/or slight dystrophy: 1 Severely abnormal with strong matrix deposition and/or severe dystrophy: 2
<b>Serosa</b>	Normal: 0 Markedly abnormal with slight matrix deposition: 1 Severely abnormal with fibrosis: 2

**Supplemental Table 1:** Semiquantitative Histopathological Scoring System. Histopathological scoring of radiation injury in each compartment (mucosa, muscularis mucosa, submucosa, muscularis propria, serosa and mesentery, as well as submucosal and mesenteric vessels) was assessed independently by two authors in a blinded manner. The individual abnormalities were assessed as normal (score = 0) or abnormal, graded according to severity (0 to 2 or 0 to 3). Finally, for every slide, the sum of the scores for each parameter in all compartments (the retrieved sum to 100) constitutes the radiation injury score.



## **Article 2 : La délétion conditionnelle du gène Hey2 dans l'endothélium modère la sévérité de la rectite radique chez la souris**

*Ces travaux sont en cours et seront soumis en tant que premier auteur dans « The Journal of European Molecular Biology Organization », EMBO Reports.*

### **Objectifs :**

Au cours de notre précédente étude nous avons pu montrer que l'irradiation induit l'EndoMT à la fois *in vitro* dans un modèle de CE microvasculaires, et *in vivo* dans un modèle préclinique de rectite radique chez la souris. De plus l'EndoMT a également été observée sur des coupes de tissus rectaux provenant de patients traités par radiothérapie pour adénocarcinome rectal suggérant l'importance de ce phénomène dans le développement des effets secondaires des radiothérapies. Parmi les mécanismes moléculaires impliqués, il est aujourd'hui admis que les voies canoniques TGF- $\beta$  et Notch participent grandement à la régulation de l'EndoMT dans des contextes à la fois physiologique et pathologique. Nous avons donc cherché à caractériser l'EndoMT radio-induite dans le but d'identifier un/des acteur(s) moléculaires pouvant constituer une base de stratégie thérapeutique. Concernant la voie Notch, les facteurs de transcription Hey (Hairy and Enhancer of split-related with YRPW motif) sont identifiés comme les principaux effecteurs de cette voie et représentent des cibles de choix. Les facteurs Hey1 et Hey2 jouent un rôle essentiel dans le développement cardiovasculaire et la vasculogenèse embryonnaire. La génération de modèles animaux déficients pour ces gènes n'a cependant pas permis d'identifier le rôle précis de ces facteurs, toutefois, quelques études ont pu mettre en relation une surexpression du gène Hey2 avec l'EndoMT *in vitro*. Dans ce contexte, nous nous sommes concentrés sur le facteur Hey2 et avons essayé de déterminer le rôle de ce dernier dans l'initiation de l'EndoMT radio-induite et *in fine*, dans l'installation de la fibrose digestive radio-induite.

### **Résultats :**

Les premiers résultats obtenus *in vitro* nous ont permis de confirmer que l'irradiation induit un changement phénotypique des HUVECs vers un phénotype mésenchymateux, caractéristique de l'EndoMT. Au niveau moléculaire, nous avons effectué une analyse de l'expression de 34 gènes et avons constaté une augmentation de l'expression des marqueurs mésenchymateux dont l' $\alpha$ -SMA, la SM22 $\alpha$  ainsi que du TGF- $\beta$ 2 et de Snail2. Nous avons

également noté la réduction de l'expression d'un certain nombre de marqueurs endothéliaux tels que le vWF, VCAM-1 et Tie1. De façon intéressante, nous avons constaté que cette évolution phénotypique était accompagnée d'une surexpression du facteur de transcription Hey2, au niveau génique et confirmé au niveau protéique, dans les HUVECs 7 jours après des expositions à 2, 10 et 20 Gy. De plus, cette augmentation d'expression de Hey2 paraît être dose-dépendante avec un pic observé 10 jours post-irradiation, et est confirmée dans un modèle d'irradiation fractionnée (10 x 2 Gy). Une faible diminution de l'expression du facteur Hey1 a également été observée dans les HUVECs irradiées. Au vu de ces résultats, nous avons orienté notre étude sur Hey2 et essayé de déterminer si ce facteur pouvait influencer le développement des dommages radio-induits. Pour se faire, nous avons mis en place une stratégie de répression de l'expression de ce gène spécifiquement dans l'endothélium chez la souris, via l'utilisation de la transgénèse ciblée. Ainsi, l'irradiation de souris Hey2 KO<sup>endo</sup> a permis de révéler que la délétion conditionnelle de Hey2 dans l'endothélium réduit la sévérité des dommages tissulaires, le dépôt d' $\alpha$ -SMA ainsi que la fréquence de l'EndoMT 14 jours post-irradiation. Concernant les dommages tissulaires radio-induits, nous avons noté une réduction des dommages muqueux, de la perte de l'épithélium bordant, et une augmentation du nombre de cryptes hyperplasiques soulignant une meilleure reprise glandulaire chez les animaux Hey2 KO<sup>endo</sup> en comparaison avec des animaux témoins.

### **Conclusions & Perspectives :**

Ces premiers travaux soutiennent notre hypothèse de départ quant au rôle potentiel de Hey2 dans l'initiation de l'EndoMT radio-induite impliquée dans le développement de la fibrose digestive. Nous avons observé que l'irradiation induit une surexpression de Hey2 à la fois *in vitro* dans les HUVECs, et *in vivo* dans notre modèle de souris Hey2 KO<sup>endo</sup> pour un temps précoce. D'autres expériences sont en cours afin de confirmer le rôle de Hey2 dans le développement des lésions radio-induites pour des temps tardifs, à savoir 10 et 14 semaines post-exposition. *In vitro*, nous allons essayer de déterminer si la modulation d'expression de Hey2 pourrait avoir une influence sur l'expression des gènes de l'EndoMT et notamment, de voir si une inhibition de l'expression de Hey2 par utilisation d'ARN interférant pourrait permettre la conservation du phénotype endothélial après irradiation. De manière opposée, nous allons étudier si la surexpression de Hey2 pourrait suffire à elle seule à induire un phénotype d'EndoMT chez les HUVECs.

# Conditional deletion of Hey2 in the endothelium mitigates radiation proctitis in mice

*Elodie Mintet<sup>1</sup>, Jérémy Lavigne<sup>1</sup>, Georges Tarlet<sup>1</sup>, Valérie Buard<sup>1</sup>, Olivier Guipaud<sup>1</sup>, Marc Benderitter<sup>2</sup>, Jean-Christophe Sabourin<sup>3</sup>, Fabien Milliat<sup>1</sup> and Agnès François<sup>1</sup>.*

<sup>1</sup> Institute for Radiological Protection and Nuclear Safety (IRSN), Department of Radiobiology and Epidemiology (SRBE), Radiobiology and Radiopathology Research Laboratory (L3R), 31 Avenue de la division Leclerc, 92265 Fontenay-aux-Roses, France.

<sup>2</sup> Institut de Radioprotection et de Sûreté Nucléaire (IRSN), Department of Radiobiology and Epidemiology (SRBE), 31 Avenue de la division Leclerc, 92265 Fontenay-aux-Roses, France.

<sup>3</sup> Department of Pathology, Rouen University Hospital, 76000 Rouen, France.

**Endothelial to mesenchymal transition (EndoMT) plays a significant role in heart development and several pathologies displaying tissue inflammation and fibrosis. We show that radiation-induced EndoMT occurs with concomitant Hey2 mRNA and protein over-expression in vitro. Conditional Hey2 deletion in the endothelium reduces EndoMT frequency and tissue damage in a preclinical model of radiation proctitis in mice. We confirm EndoMT involvement in the development of radiation proctitis and propose Hey2 as one important participant in radiation-induced EndoMT and tissue injury.**

Running title: Hey2 deletion mitigates radiation proctitis.

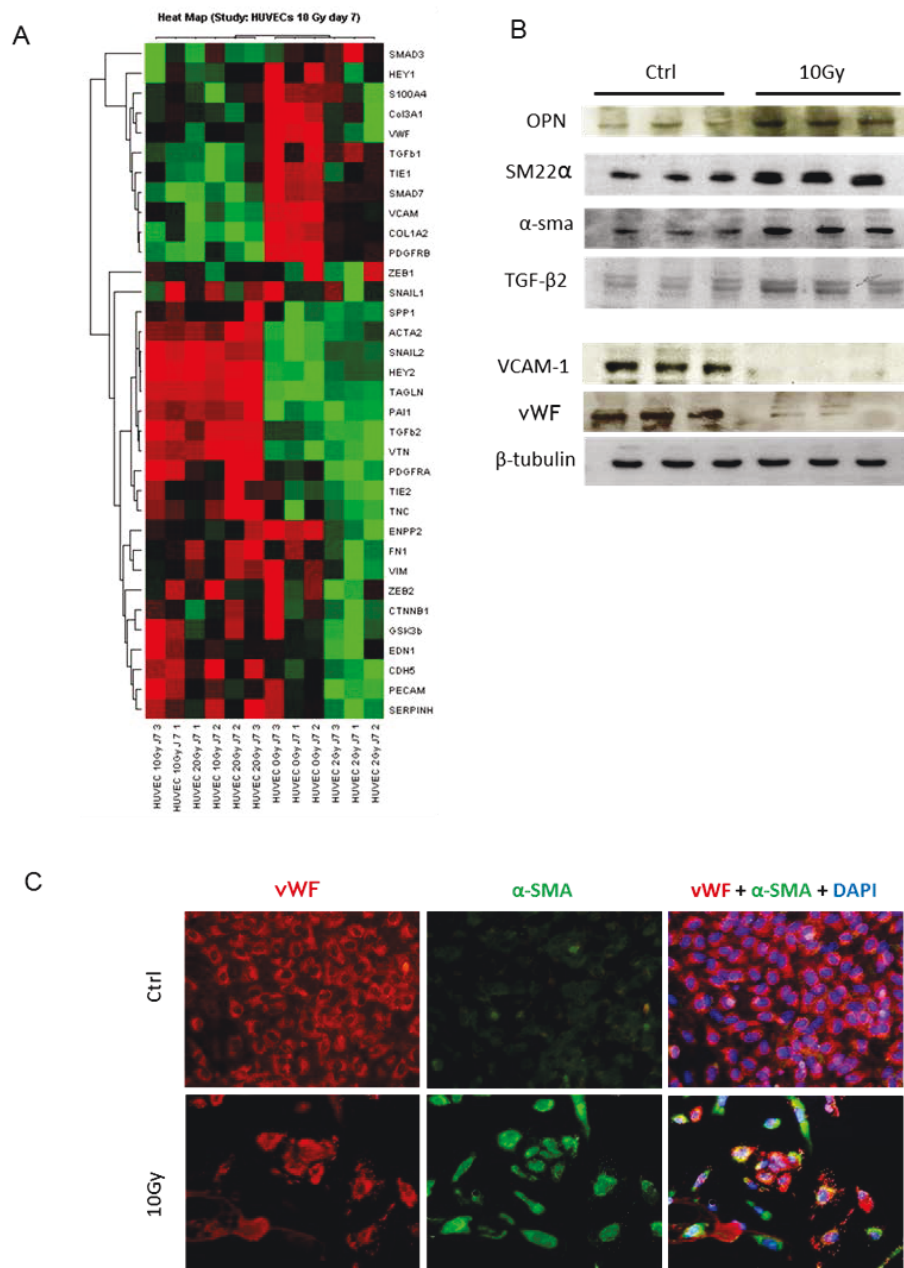
Key words: Endothelial-to-mesenchymal transition/fibrosis/Hey2/proctitis/radiation.

## INTRODUCTION

Endothelial to mesenchymal transition illustrates the preserved plastic properties of adult cells and concerns the phenotypic switch of endothelial cells toward mesenchymal cells (fibroblast, myofibroblast, smooth muscle cells). EndoMT was first discovered as a mechanism responsible for cardiac valves formation during embryogenesis (1). Rapidly, EndoMT appeared as implicated in several systemic diseases such as fibrodysplasia ossificans progressiva (2) or systemic sclerosis (3), and cardiac, renal or

pulmonary fibrosis of varying aetiologies (4-6). Previous mechanistic studies highlighted TGF $\beta$  and Notch signalling pathways as promoting EndoMT (7, 8). The canonical Notch pathway is highly conserved in vertebrates and is essential in embryonic development, organogenesis and vascular remodelling in adults (9). Notch over-expression is associated with excessive endocardic EndoMT, myocardium enlargement and the formation of hyperplastic valves, confirming the role of Notch signalling pathway in EndoMT (8). Activated Notch pathway carries out target genes transactivation among which transcriptional repressors of the Hes, Hers or Hey (hairly/enhancer of split-related with YRPW motif) genes (10). Among Notch targets and together with Hey1, Hey2 has been implicated in embryogenesis, and Hey2 deficiency in mice displays defects in cardiovascular development (11). By the way several studies demonstrating the role of Hey2 in cardiac valves formation and especially in endocardic cells epithelial to mesenchymal transition (12). Moreover there are few studies pointing out the putative role of Hey2 in stress-induced EndoMT (13, 14).

Normal digestive tissue response to ionizing radiation exposure is characterized by acute inflammation and late fibrosis (15). We previously showed in a preclinical model of radiation proctitis in Tie2-GFP mice that radiation-induced tissue inflammation and scarring process offers environment conditions favouring EndoMT, and that



**Fig 1: Characterization of radiation-induced EndoMT process in HUVECs 7 days after 10 Gy exposure.** (A) Unsupervised hierarchical clustering analysis based on qPCR analysis separated samples into two main group, overexpressed (in green) and downregulated (in red). (B) Western-Blot analysis based on global genes expression analysis. (C) Co-immunostaining of von Willebrand Factor (vWF in red) and  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA). Merging signal appears in yellow. Original magnification x 400.

EndoMT is also present in human radiation proctitis (16). Here we report that irradiation is a pro-inflammatory stimulus leading to EndoMT in vitro associated with increased Hey2 mRNA and protein expression. Conditional deletion of Hey2

in the endothelium in mice reduces EndoMT frequency and the severity of radiation-induced proctitis.

Genes (protein)	20 Gy single dose Day 7	20 Gy fractionated dose Day 7 post last fraction
ACTA2 (alpha-SMA)	5.64±0.85**	2.45±0.22**
HEY2	9.57±0.43***	2.64±0.53*
SERPINE 1 (PAI-1)	1.77±0.06***	1.98±0.24*
TAGLN (SM22-alpha)	24.42±2.36***	14.72±1.65**
TGFbeta 2	1.77±0.19*	2.39±0.27*
TNC	4.32±0.05	348.00±17.79***
VTN	5.70±0.9**	6.62±0.35***
TIE1	0.42±0.06***	0.50±0.05**
TIE2	0.87±0.04*	0.53±0.05**
vWF	0.26±0.03**	1.29±0.10

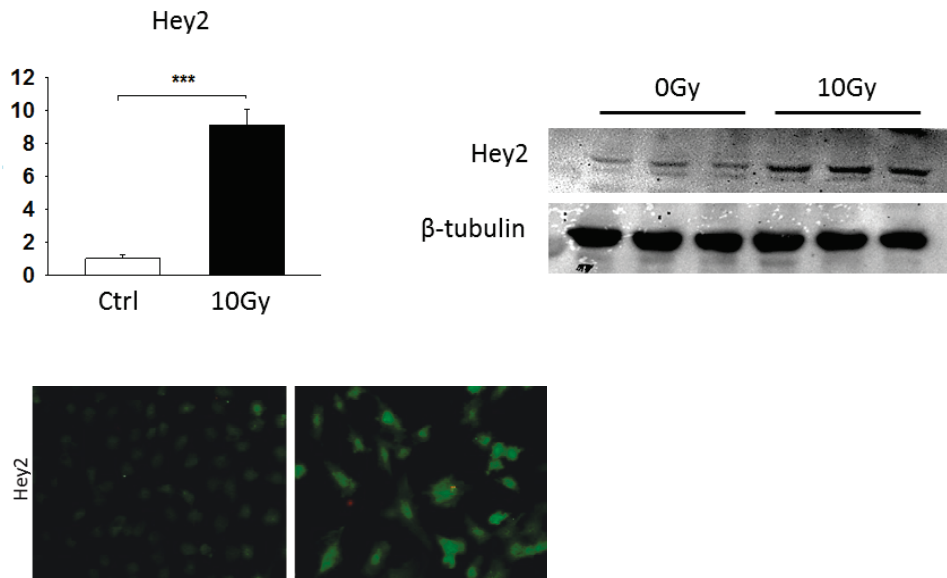
**Table 1:** fold changes in genes mRNA levels in HUVECs, comparison between 7 days after 20 Gy single dose and 7 days post-last fraction after fractionated dose exposure to 20 Gy. Fractionation was given as 2 Gy per day, 5 days a week with week-end break. \*p<0.05; \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Irradiation induces endothelial to mesenchymal transition in HUVECs

Endothelial cells response to radiation exposure is characterized by cell apoptosis and long-lasting phenotypic changes referred to as radiation-induced “activated” phenotype. Activated endothelial cells demonstrate pro-inflammatory, pro-thrombotic and anti-fibrinolytic activities (17). Here we show that ionizing radiations are also able to induce phenotypic switch in HUVECs resembling EndoMT, as previously demonstrated in human aortic endothelial cells (18), human intestinal microvascular endothelial cells (16) and human pulmonary endothelial cells (19). EndoMT is illustrated by heat map representation of expression levels of 34 different genes related to endothelial and mesenchymal phenotypes and molecular actors of the EndoMT process 7 days following single doses of 2, 10 or 20 Gy exposure (figure 1A). Results show changes in expression levels of genes coding for proteins recognized as witness or inducers of EndoMT process such as increased  $\alpha$ -SMA, SM-22 $\alpha$  or TGF- $\beta$ 2, and decrease of vWF and VCAM1, or decreased Tie1 expression, which deficiency has been shown to induce EndoMT (20). Radiation-induced fold changes of several

genes are dose-dependent (supplemental figure 1). Phenotypic switch at mRNA level is conserved when cells are exposed to fractionated irradiation (20 Gy administrated as 2 Gy daily x10, with week-end break) as shown in table 1. Irradiation increased protein levels of mesenchymal markers such as smooth muscle 22-alpha (SM-22 $\alpha$ ) and alpha-smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) and reduced protein levels of endothelial markers such as vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) and von Willebrand factor (vWF) suggesting EndoMT (figure 1B). Co-expression of  $\alpha$ -SMA and vWF in part of irradiated cells was confirmed by double fluorescence immunostaining (yellow merging signal, figure 1C).



**Fig 2:** Induction of Hey2 expression in irradiated HUVECs 7 days after 10 Gy exposure. Hey 2 expression was assessed by qPCR, western blotting and immunocytochemistry.

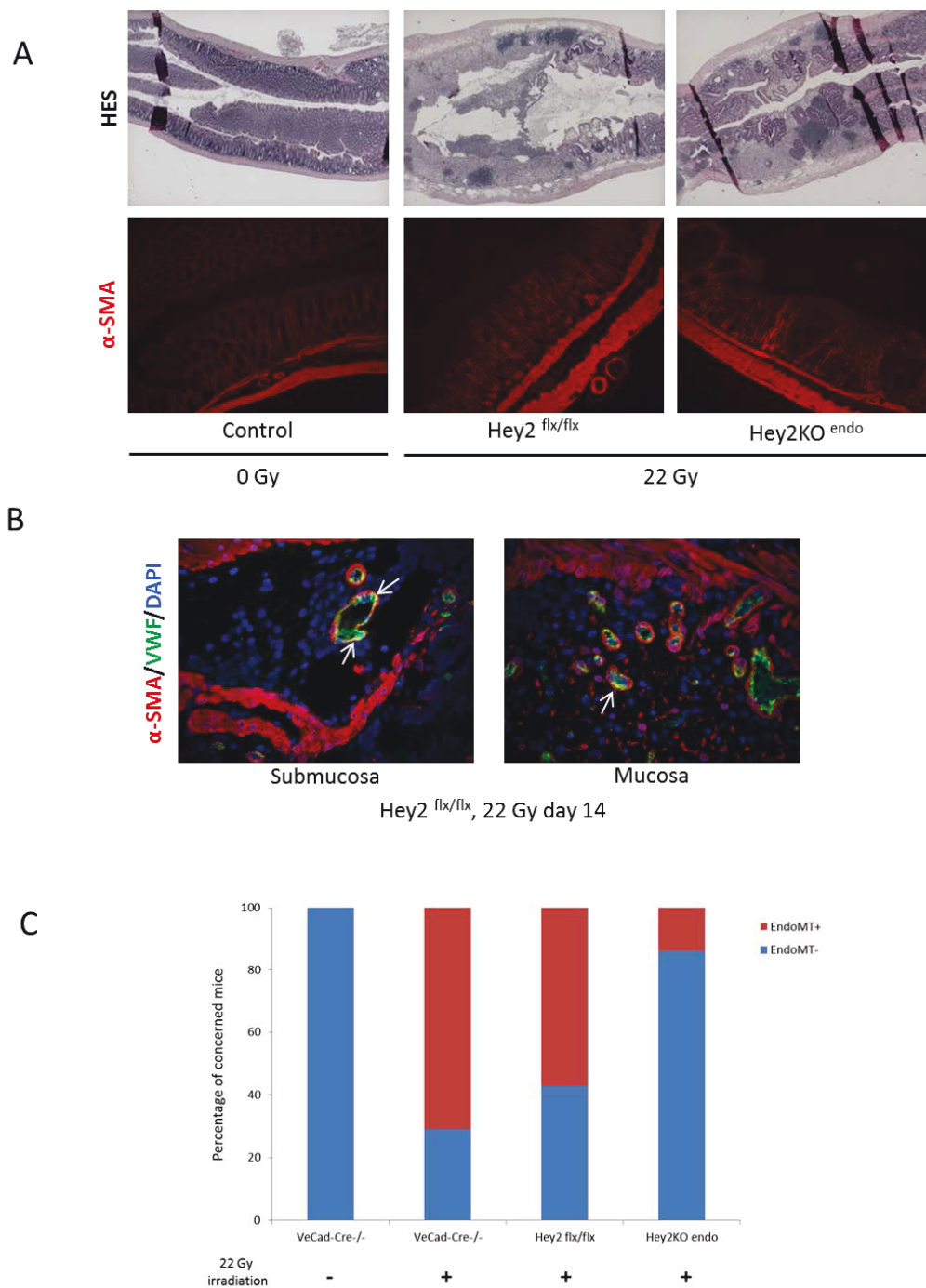
#### Endothelial to mesenchymal transition is associated with Hey2 overexpression in HUVECs

EndoMT was initially discovered as an essential mechanism for heart development, with an important role played by Notch pathway in the formation of cardiac valves (21). Hairly and Enhancer of Split (HES)-related with YRPW motif (Hey) genes (Hey1, Hey2 and HeyL) are the main target genes of the canonical Notch signalling pathway. Inactivation of Hey2 results in severe embryonic defects in heart development, whereas deficiency in Hey1 alone does not (22). In accordance with previous studies relating Hey2 and EndoMT in embryonic development, we demonstrate that EndoMT induced by exogenous stress is also associated with Hey2 mRNA and protein overexpression (figure 2). Radiation-induced Hey2 mRNA overexpression is dose-dependent (supplemental figure 1), maintained with time until at least 10 days post-exposure and independent of culture plastic coating. Hey1 expression level is not modified by radiation exposure (supplemental figure 2).

#### Conditional deletion of Hey2 in the endothelium reduces endothelial to mesenchymal transition and mitigates radiation proctitis in mice

Endothelial and mesenchymal markers double positive cells suggesting EndoMT have been found in various inflamed and fibrosed tissues following different types of insult. EndoMT has been shown to contribute to cardiac fibrosis in Tie1-LacZ mice, with up to 35% of FSP1+/ $\alpha$ -SMA+ cells of endothelial origin in injured hearts (5). Bleomycin-induced lung fibrosis in Tie2-LacZ mice also demonstrates 16% of fibroblasts having an endothelial origin (23). Models of obstructive nephropathy, diabetic nephropathy and Alport disease in mice show 30 to 50% of fibroblasts expressing CD31 (24). More recently, EndoMT has been observed in tissues from patients suffering from Crohn's disease and ulcerative colitis, and in a model of TNBS-induced intestinal inflammation and fibrosis in Tie2-GFP mice (25). Normal digestive tissue response to radiation exposure is characterized by inflammation and fibrosis, and we recently demonstrated that EndoMT participates to tissue injury in radiation-induced proctitis in





**Fig 3:** *In vivo* evidence of endothelial-to-mesenchymal transition (EndoMT) in colorectal vessels of 22 Gy-irradiated mice. A: Images of Hemalun-Eosin-Safran coloration and  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) immunostaining in control rectal tissues and in 22 Gy-irradiated tissues of Hey2<sup>flx/flx</sup> and Hey2KO<sup>endo</sup> mice 14 days post-exposure. B: Representative images of immunofluorescence double labeling of  $\alpha$ -SMA (mesenchymal marker, red) and von Willebrand factor (vWF, endothelial marker, green) in irradiated Hey2<sup>flx/flx</sup> mice 14 days post 22 Gy localized exposure to the colorectum.  $\alpha$ -SMA<sup>+</sup>/vWF<sup>+</sup> double labeled cells (yellow, arrows) are observed in submucosal and mucosal vessels of inflamed rectum. No merging signal was observed in unirradiated tissues. C: Percentage of unirradiated VeCad-Cre<sup>-/-</sup> and 22 Gy-irradiated VeCad-Cre<sup>-/-</sup>, Hey2<sup>flx/flx</sup> and Hey2KO<sup>endo</sup> mice concerned with EndoMT 14 days post-exposure. n=7 per group. Original magnification x400 (A).



TIE2-GFP mice (16). Following in vitro observations of HEY2 mRNA and protein overexpression in irradiated endothelial cells, we crossed Hey2flx/flx mice with VE-CadCre<sup>+/+</sup> mice to obtain Hey2flx/flx/VE-CadCre<sup>+/-</sup> mice (Hey2KOendo) in which hey2 expression is invalidated specifically in the endothelial compartment. Here we show that conditional deletion of hey2 in the endothelium reduces the severity of rectal tissue damage,  $\alpha$ -SMA deposition and EndoMT frequency (figure 5). Tissue protection in Hey2KOendo mice was characterized by less percentage of mucosa concerned with bordering epithelial loss and more multilobed glandular hyperplasia (supplemental figure 3). Kokubo et al. demonstrated that hey1 and hey2 genes were implicated in atrioventricular valves cushion formation, with hey2 particularly concerned by both endocardic cells epithelial to mesenchymal transition (EMT) and post-EMT processes in valves development(12). Several data have been obtained using hey1, hey2 or double hey1/hey2 mutant mice and have help to the understanding of cardiac and vascular development. If Notch signalling pathway has been implicated in the EndoMT process during cardiac development and on endothelial cells in vitro (26) there are to our knowledge actually no data concerning the role of its main downstream gene hey2 in stress-induced EndoMT.

Here we demonstrate that hey2 is partly responsible for radiation-induced EndoMT and confirm previous study suggesting a role for EndoMT in radiation proctitis development (16). Moreover, conditional deletion of Hey2 in the endothelium is sufficient to reduce acute tissue injury, confirming the cornerstone role of the vascular compartment in the initiation of normal tissue radiation damage. Finally, we observed that tissue protection was associated with higher frequency of glandular hyperplasia in Hey2KOendo mice. Notch1 and Notch2 have been recognized as regulators of intestinal stem cell function and post-injury regeneration including after radiation exposure (27, 28). Further studies will be necessary to clarify if their downstream target gene Hey2 may influence intestinal stem cells compartment.

## METHODS

**Cell line.** Primary HUVECs were purchased from Lonza (Verviers, Belgium) and grown at 37°C with 5% CO<sub>2</sub> in EBM-2 MV medium.

**Hey2 conditional null mice.** To study the consequences of Hey2 inactivation on radiation-induced EndoMT in vivo, mice possessing LoxP sites on either side of exons 2 and 3 of the target gene Hey2 (Hey2flx/flx; Hey2tm1Eno / J; The Jackson Laboratory, Bar Harbor, USA) were bred with mice with Cre recombinase expression in endothelial cells under the endothelial promoter VE-Cadherin (VECad-Cre<sup>+/+</sup> mice). The following mice were used: Hey2 flx/flx/VECad-Cre <sup>-/-</sup> mice (named Hey2 flx/flx) and Hey2 flx/flx/VECad-Cre <sup>+/-</sup> mice (named Hey2 KO endo).

**Mouse genotyping.** Genomic tail DNA was extract (KAPA mouse genotyping kit, Kapa Biosystem, USA) and amplified by PCR. Reverse and forward primers were provided by Life Technologies, France.

**Irradiation.** The protocol (P13-18) for animal use in this project was reviewed and approved by the national ethics committee n°81. For colorectal irradiation, mice were anesthetized (1.5% isoflurane), and a single dose of 22 Gy was delivered through a 1 x 0.8 cm window centered on the colorectal region, using Elekta Synergy® Platform (Elekta S.A.S. France, Boulogne, France) delivering 4MV X-rays at 2.6 Gy/min. Cell irradiation (2, 10 or 20 Gy single doses) was performed at cell confluence using a <sup>137</sup>Cs source (IBL 637, CisBio, Saclay, France; dose rate 1 Gy min<sup>-1</sup>). For fractionated irradiation, confluent cells were exposed to 2 Gy daily fractions, 5 days a week with week-end break.

**Tissue harvesting, histology and immunohistology.** For immunofluorescence double labeling, sections were incubated with monoclonal mouse anti-human smooth muscle alpha, clone 1A4 (Dako) and polyclonal rabbit anti-human vWF (Dako) at the same time followed by corresponding secondary Alexa Fluor<sup>®</sup> -conjugated antibodies (Life Technologies). Sections were mounted in Vectashield mounting medium with DAPI (Eurobio/Abcys).

**Immunofluorescence.** Cells were incubated with polyclonal rabbit anti-human von Willebrand factor (vWF) (Dako, Les Ulis, France), mouse monoclonal anti-human alpha-sma clone 1A4 (Dako) or followed by corresponding secondary antibodies (Alexa Fluor<sup>®</sup>-conjugated antibodies, Life Technologies, Saint Aubin, France). For double immunostaining, primary antibodies were incubated together, and corresponding secondary antibodies too. Slides were mounted in Vectashield mounting medium with DAPI (Eurobio/Abcys, Courtaboeuf, France). For tissue immunofluorescence double labeling, 5  $\mu$ m paraffin sections were incubated with rabbit polyclonal anti-smooth muscle alpha (abcam) followed by corresponding secondary Alexa Fluor<sup>®</sup>-conjugated antibody (Life Technologies), and sheep polyclonal anti-vWF FITC-conjugated (Abcam). Sections were mounted in Vectashield mounting medium with DAPI (Eurobio/Abcys).

**Western blots.** Cell total protein was extracted using RIPA buffer supplemented with phosphatase and protease inhibitors (Roche Diagnostics, Meylan, France). Protein concentration was determined using a BCA assay (Sigma Aldrich) and equal amounts of protein were resolved by SDS-PAGE. The blocked membrane was incubated with primary antibodies overnight at 4°C. Bands were detected by using a horseradish peroxidase secondary antibody and visualized with ECL Plus reagent (GE Healthcare, Buc, France).  $\beta$ -Tubulin or GAPDH was used as loading control (Santa Cruz Biotechnology).

**Quantitative real time PCR.** Total RNA was prepared with the total RNA isolation kit RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA). After quantification on a NanoDrop ND-1000 apparatus (NanoDrop Technologies, Rockland, DE), reverse transcription was performed with 1  $\mu$ g RNA using a reverse transcription kit from Applied Biosystems (Courtaboeuf, France). Quantitative PCR was carried out on a 7900HT Fast-Real Time PCR system (Applied Biosystems) using pre-developed TaqMan<sup>®</sup> Gene Expression assays (Applied Biosystems), with GAPDH for cells and 18S for tissues as housekeeping genes. Relative mRNA was quantified using the  $\Delta\Delta$ CT method. DataAssist<sup>TM</sup> software (Life Technologies) was

used to perform hierarchical clustering with global normalization and Pearson's correlation).

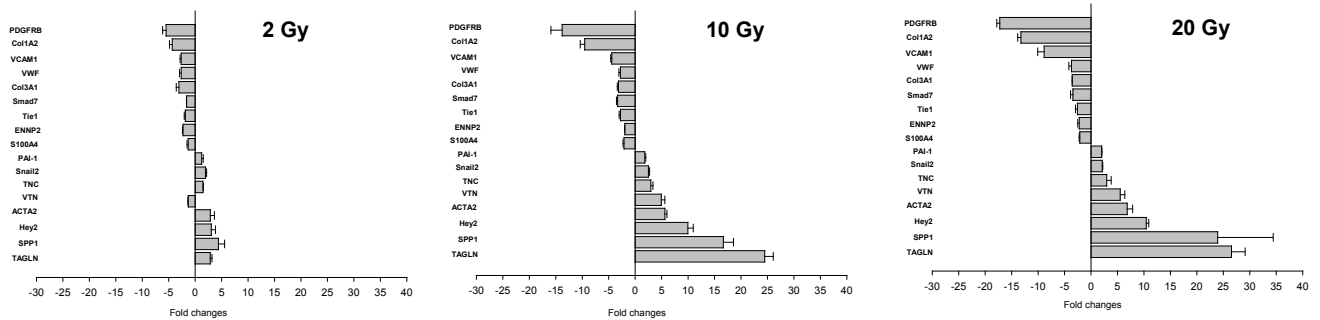
**Statistical analyses.** Data are given as means  $\pm$  SEM. Statistical analyses were performed by ANOVA, Student's t-test or the Mann-Whitney rank sum test when appropriate, with a level of significance of  $p < 0.05$ .

## REFERENCES

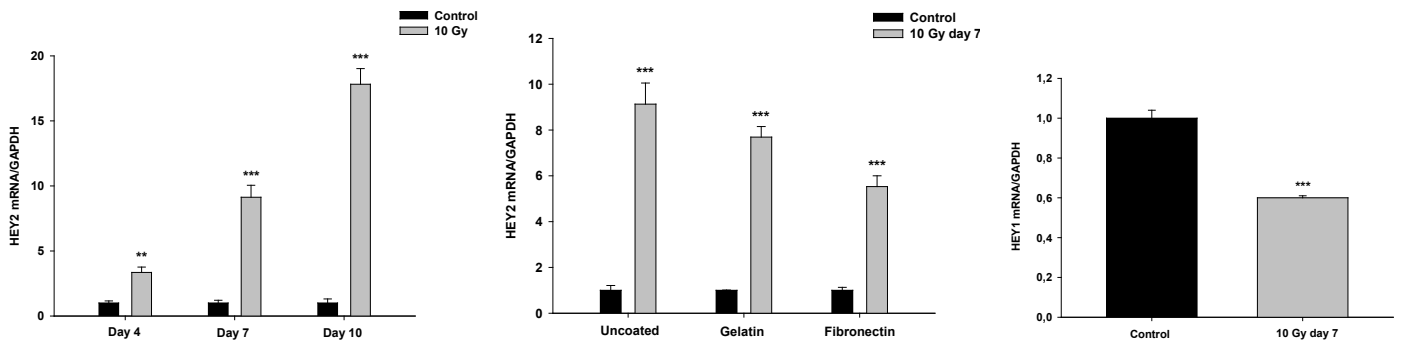
1. Liebner S, Cattelino A, Gallini R, Rudini N, Iurlaro M, Piccolo S, et al. Beta-catenin is required for endothelial-mesenchymal transformation during heart cushion development in the mouse. *The Journal of cell biology*. 2004;166(3):359-67. Epub 2004/08/04.
2. Medici D, Shore EM, Lounev VY, Kaplan FS, Kalluri R, Olsen BR. Conversion of vascular endothelial cells into multipotent stem-like cells. *Nature medicine*. 2010;16(12):1400-6. Epub 2010/11/26.
3. Jimenez SA. Role of endothelial to mesenchymal transition in the pathogenesis of the vascular alterations in systemic sclerosis. *ISRN rheumatology*. 2013;2013:835948. Epub 2013/11/01.
4. Arciniegas E, Frid MG, Douglas IS, Stenmark KR. Perspectives on endothelial-to-mesenchymal transition: potential contribution to vascular remodeling in chronic pulmonary hypertension. *American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology*. 2007;293(1):L1-8. Epub 2007/03/27.
5. Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, Dorfman AL, McMullen JR, Gustafsson E, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nature medicine*. 2007;13(8):952-61. Epub 2007/07/31.
6. He J, Xu Y, Koya D, Kanasaki K. Role of the endothelial-to-mesenchymal transition in renal fibrosis of chronic kidney disease. *Clinical and experimental nephrology*. 2013;17(4):488-97. Epub 2013/02/23.
7. Kokudo T, Suzuki Y, Yoshimatsu Y, Yamazaki T, Watabe T, Miyazono K. Snail is required for TGFbeta-induced endothelial-mesenchymal transition of embryonic stem cell-derived endothelial cells. *Journal of cell science*. 2008;121(Pt 20):3317-24. Epub 2008/09/18.
8. Liu J, Dong F, Jeong J, Masuda T, Lobe CG. Constitutively active Notch1 signaling promotes endothelialmesenchymal transition in a conditional transgenic mouse model. *International journal of molecular medicine*. 2014;34(3):669-76. Epub 2014/06/28.
9. Lai EC. Notch signaling: control of cell communication and cell fate. *Development*. 2004;131(5):965-73. Epub 2004/02/20.

10. Mayeuf A, Relaix F. [Notch pathway: from development to regeneration of skeletal muscle]. *Medecine sciences : M/S*. 2011;27(5):521-6. Epub 2011/05/26. La voie Notch: du developpement a la regeneration du muscle squelettique.
11. Fischer A, Schumacher N, Maier M, Sendtner M, Gessler M. The Notch target genes Hey1 and Hey2 are required for embryonic vascular development. *Genes & development*. 2004;18(8):901-11. Epub 2004/04/27.
12. Kokubo H, Miyagawa-Tomita S, Nakazawa M, Saga Y, Johnson RL. Mouse hesr1 and hesr2 genes are redundantly required to mediate Notch signaling in the developing cardiovascular system. *Developmental biology*. 2005;278(2):301-9. Epub 2005/02/01.
13. Fu Y, Chang AC, Fournier M, Chang L, Niessen K, Karsan A. RUNX3 maintains the mesenchymal phenotype after termination of the Notch signal. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(13):11803-13. Epub 2011/02/04.
14. Gasperini P, Espigol-Frigole G, McCormick PJ, Salvucci O, Maric D, Uldrick TS, et al. Kaposi sarcoma herpesvirus promotes endothelial-to-mesenchymal transition through Notch-dependent signaling. *Cancer research*. 2012;72(5):1157-69. Epub 2012/01/13.
15. Bentzen SM. Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: radiobiology meets molecular pathology. *Nature reviews Cancer*. 2006;6(9):702-13. Epub 2006/08/25.
16. Mintet E, Rannou E, Buard V, West G, Guipaud O, Tarlet G, et al. Identification of Endothelial-to-Mesenchymal Transition as a Potential Participant in Radiation Proctitis. *The American journal of pathology*. 2015. Epub 2015/07/18.
17. Milliat F, Francois A, Tamarat R, Benderitter M. [Role of endothelium in radiation-induced normal tissue damages]. *Annales de cardiologie et d'angiologie*. 2008;57(3):139-48. Epub 2008/06/27. Role de l'endothelium dans les dommages radio-induits aux tissus sains.
18. Kim M, Choi SH, Jin YB, Lee HJ, Ji YH, Kim J, et al. The effect of oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) on radiation-induced endothelial-to-mesenchymal transition. *International journal of radiation biology*. 2013;89(5):356-63. Epub 2013/01/08.
19. Choi SH, Hong ZY, Nam JK, Lee HJ, Jang J, Yoo RJ, et al. A Hypoxia-Induced Vascular Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Development of Radiation-Induced Pulmonary Fibrosis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2015;21(16):3716-26. Epub 2015/04/26.
20. Garcia J, Sandi MJ, Cordelier P, Binetruy B, Pouyssegur J, Iovanna JL, et al. Tiel deficiency induces endothelial-mesenchymal transition. *EMBO reports*. 2012;13(5):431-9. Epub 2012/03/17.
21. Nosedà M, McLean G, Niessen K, Chang L, Pollet I, Montpetit R, et al. Notch activation results in phenotypic and functional changes consistent with endothelial-to-mesenchymal transformation. *Circulation research*. 2004;94(7):910-7. Epub 2004/02/28.
22. Kokubo H, Miyagawa-Tomita S, Tomimatsu H, Nakashima Y, Nakazawa M, Saga Y, et al. Targeted disruption of hesr2 results in atrioventricular valve anomalies that lead to heart dysfunction. *Circulation research*. 2004;95(5):540-7. Epub 2004/08/07.
23. Hashimoto N, Phan SH, Imaizumi K, Matsuo M, Nakashima H, Kawabe T, et al. Endothelial-mesenchymal transition in bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *American journal of respiratory cell and molecular biology*. 2010;43(2):161-72. Epub 2009/09/22.
24. Zeisberg EM, Potenta SE, Sugimoto H, Zeisberg M, Kalluri R. Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*. 2008;19(12):2282-7. Epub 2008/11/07.
25. Rieder F, Kessler SP, West GA, Bhilocha S, de la Motte C, Sadler TM, et al. Inflammation-induced endothelial-to-mesenchymal transition: a novel mechanism of intestinal fibrosis. *The American journal of pathology*. 2011;179(5):2660-73. Epub 2011/09/29.
26. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of clinical investigation*. 2009;119(6):1420-8. Epub 2009/06/03.
27. Carulli AJ, Keeley TM, Demitrack ES, Chung J, Maillard I, Samuelson LC. Notch receptor regulation of intestinal stem cell homeostasis and crypt regeneration. *Developmental biology*. 2015;402(1):98-108. Epub 2015/04/04.
28. Qu D, May R, Sureban SM, Weygant N, Chandrasekaran P, Ali N, et al. Inhibition of Notch signaling reduces the number of surviving Dclk1+ reserve crypt epithelial stem cells following radiation injury. *American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology*. 2014;306(5):G404-11. Epub 2013/12/26.

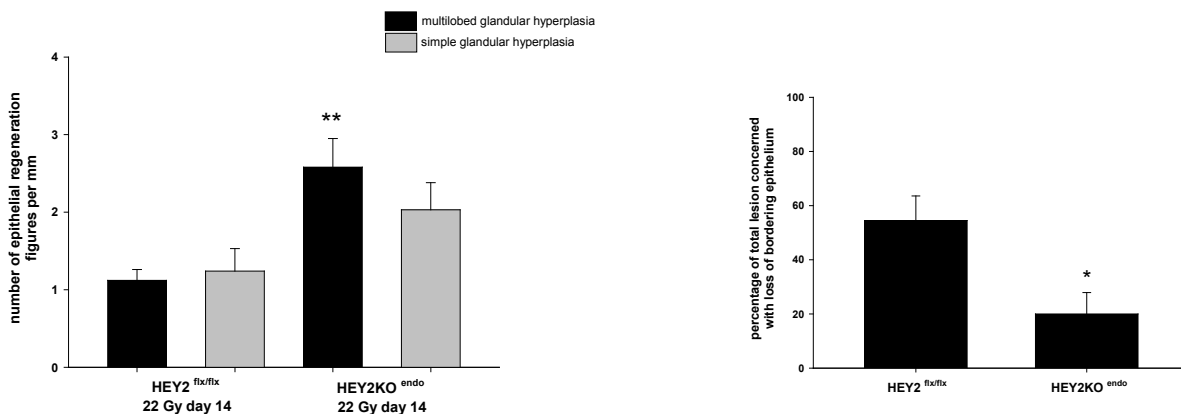
**Supplemental figure 1:** dose-dependent fold changes in gene mRNA expression in HUVECs 7 days following 2, 10 and 20 Gy single doses exposure.



**Supplemental figure 2:** radiation-induced mRNA expression of Hey2 is maintained with time and independent of plastic coating. Hey1 mRNA expression is not modified by cell radiation exposure to 10 Gy.



**Supplemental figure 3:** Hey2KO<sup>endo</sup> mice show reduced radiation-induced proctitis severity, with increased multilobed crypt hyperplasia and reduced percentage of mucosa concerned with loss of bordering epithelium.



## Discussion & Perspectives

Le cancer constitue l'un des fléaux du XXI<sup>ème</sup> siècle et l'élaboration et la mise en place d'un plan efficace de lutte contre ce dernier représente un enjeu majeur de santé publique. On note ces dernières décennies une hausse considérable du nombre de cas de cancers en France qui peut en partie s'expliquer par une sensibilisation de la population à l'importance du dépistage précoce pour augmenter les chances de guérison. La radiothérapie fait partie intégrante, avec la chimiothérapie, de l'arsenal thérapeutique déployé dans la lutte contre le cancer. On estime aujourd'hui que plus de la moitié des traitements anti-cancéreux font appel à la radiothérapie seule ou en association avec la chimiothérapie, la chirurgie ou l'hormonothérapie. Malgré l'amélioration des techniques d'irradiation et de la balistique, certains organes peuvent se retrouver dans le champ d'irradiation et recevoir une dose non négligeable de rayonnements ionisants, on parle d'organes à risque (OAR). L'irradiation de ces tissus sains est responsable des effets aigus délétères observés en clinique et favorise le développement de pathologies secondaires radio-induites chroniques pouvant survenir des années après le début de la radiothérapie. Ces effets secondaires chroniques sont en général délétères vis-à-vis de la qualité de vie des patients et peuvent engager le pronostic vital de ces derniers dans les cas les plus graves. Selon les chiffres de l'institut National du Cancer, 355 000 nouveaux cas de cancer ont été recensés en 2014 dont la moitié d'entre eux concernent des tumeurs de la sphère abdomino-pelvienne. Dans ce contexte, l'intestin grêle terminal, le côlon et le rectum sont identifiés comme des OAR dans le traitement des cancers de la prostate, de l'endomètre ou du col de l'utérus. La fibrose radio-induite est observée chez 5 à 10 % des patients. Comme explicité tout au long de ce manuscrit, le tube digestif est une cible privilégiée des rayonnements ionisants due à l'importante radiosensibilité des cellules qui le composent ainsi qu'à son organisation en série. La réponse des tissus sains aux rayonnements est assimilable à un processus cicatriciel chronique faisant intervenir des acteurs cellulaires issus de compartiments différents. Parmi eux, le système immunitaire, l'épithélium, le mésenchyme et l'endothélium participent ensemble à la réponse orchestrée responsable de l'initiation et de la mise en place de la pathologie fibrotique.

Concernant le compartiment endothélial, il existe un consensus au sein de la communauté scientifique qui s'accorde à placer l'atteinte de ce compartiment comme un évènement central dans la réponse des tissus sains à l'irradiation. Il est en effet établi que la mort par apoptose et l'activation des cellules endothéliales participent grandement à la mise en place des évènements cicatriciels et à la chronicité des lésions radio-induites. Cependant, des zones de flou persistent quant aux évènements cellulaires et moléculaires permettant de relier les effets aigus aux complications chroniques.

Dans ce contexte, ce travail de thèse s'est concentré sur un mécanisme cellulaire particulier appelé la transition endothélium-mésenchyme. Bien que ce processus ait été mis en évidence depuis les années 70 au cours de l'ontogenèse cardiovasculaire, l'EndoMT est identifiée comme un phénomène récent, dont l'existence reste encore controversée au sein de la communauté scientifique, en particulier dans le contexte pathologique. Toutefois, l'augmentation de l'intérêt suscité par ce processus dans diverses pathologies a favorisé l'accumulation d'un certain nombre de preuves en faveur de son existence. Il apparaît aujourd'hui que l'EndoMT est étroitement liée à la présence de cytokines pro-inflammatoires telles que le TGF- $\beta$ , et l'IL-1 $\beta$ , à l'activation des voies Notch, Wnt et BMP et constitue un processus non-négligeable dans le développement de la fibrose au sein de différents tissus. Parmi les principaux mécanismes mis en cause dans l'installation de la fibrose radio-induite, l'activation soutenue et persistante de la réponse inflammatoire représente un paramètre initiateur déterminant de cette pathogenèse. De fait, la question de l'implication potentielle de l'EndoMT dans le développement de la fibrose digestive radio-induite est apparue légitime. Enfin, il existe un manque de données permettant de relier ce phénomène à l'irradiation soulignant le caractère novateur de ces travaux.

Ainsi, ce travail de thèse a permis d'améliorer les connaissances sur la participation endothéliale dans le développement de la fibrose digestive radio-induite. **Le premier objectif a consisté à mettre en évidence l'EndoMT aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* dans le contexte de l'irradiation. Par la suite, ce travail s'est orienté vers l'identification d'un/des acteur(s) moléculaire(s) prenant part à ce phénomène et pouvant constituer une cible thérapeutique d'intérêt dans le traitement de la fibrose digestive radio-induite.**



## 1. Mise en évidence de l'EndoMT radio-induite chez l'homme

Nous avons dans un premier temps cherché à mettre en évidence le processus d'EndoMT chez l'homme après irradiation. Pour se faire, nous avons disposé de coupes histologiques de rectums de 24 patients, 5 à 7 semaines après radiothérapie préopératoire pour adénocarcinome rectal (dose totale de 45 Gy à raison de 2 Gy par jour, 5 jours par semaine), associée à une chimiothérapie au 5-fluorouracile (5-FU, tissus provenant de l'Institut Gustave Roussy, IGR, Villejuif). Deux prélèvements ont été effectués et mis en blocs par le service d'anatomopathologie de l'IGR pour chaque patient : un prélèvement dans le volume cible proche de la tumeur, et un prélèvement plus éloigné, en dehors du volume cible. Ainsi, chaque patient constitue son propre contrôle. Au niveau histologique, les tissus irradiés présentaient une inflammation de la muqueuse et de la sous-muqueuse associée à un important dépôt collagénique, caractéristique de la rectite radique. Un système de score semi quantitatif (Radiation Injury Score, RIS) a par ailleurs été établi au laboratoire afin d'évaluer le niveau lésionnel de chacun des compartiments tissulaires (muqueuse, muscularis mucosa, sous-muqueuse, muscularis propria, séreuse, et mésentère). Ainsi, 48 échantillons ont été analysés et scorés sur une échelle de 0 (normal) à 3 (dommages sévères) pour chaque compartiment tissulaire, le tout rapporté à 100. Par la suite, la réalisation d'un co-marquage vWF et  $\alpha$ -SMA sur ces mêmes tissus a révélé la présence (au niveau de la muqueuse et de la sous-muqueuse) de cellules double positives dans les tissus irradiés, phénotype caractéristique de l'EndoMT. Ces résultats démontrent pour la première fois l'existence de l'EndoMT dans un contexte de rectite radique chez l'homme. De plus, ils viennent appuyer de précédents travaux effectués par Rieder *et al* qui ont été les premiers à mettre en évidence l'EndoMT au niveau du tube digestif chez des patients atteints de MC et de RCH (Rieder *et al.* 2011). Nos résultats ont montré que la fréquence des cellules en EndoMT est la plus élevée au sein des tissus les plus lésés (RIS supérieur à 75), présentant une forte composante inflammatoire. Ceci est en accord avec les données de la littérature qui soulignent l'importance des cytokines pro-inflammatoires dans l'initiation de ce phénomène (Maleszewska *et al.* 2013; Montorfano *et al.* 2014).



## 2. Choix du modèle préclinique chez la souris

Nous avons choisi de centrer cette étude sur le modèle d'irradiation colorectale chez la souris, afin de modéliser les lésions observées chez les patients de l'IGR traités pour adénocarcinome rectal, chez lesquels nous avons mis en évidence l'existence du processus d'EndoMT. La modélisation de la rectite radique a été mise en place chez la souris FVB/N et repose sur une irradiation externe (rayons  $\gamma$ ,  $^{60}\text{Co}$ ) à une dose unique de 27 Gy (0,73 Gy.min<sup>-1</sup>) centrée sur le côlo-rectum (fenêtre de 0,75 cm x 1 cm). Ce modèle est utilisé depuis plusieurs années au L3R. La dose totale, son administration en dose unique et le volume d'irradiation choisis ne correspondent évidemment pas aux protocoles utilisés en clinique mais reposent sur un certain nombre d'arguments issus de la bibliographie et de l'expérience propre du laboratoire.

Tout d'abord, ce modèle d'irradiation dose unique chez la souris a pour objectif de modéliser les lésions observées chez les patients et non un protocole de fractionnement. Chez le rongeur, qui est moins radiosensible que l'homme, les irradiations colorectales fractionnées nécessitent toujours de très fortes doses par fraction (de 5 à 15 Gy) pour générer des lésions tissulaires, qui ne correspondent pas non plus aux protocoles cliniques. Dans l'avenir et avec l'évolution des pratiques de radiothérapie et en particulier l'irradiation stéréotaxique des tumeurs prostatiques, ces modèles d'irradiation dose unique à forte dose resteront d'actualité.

Le choix de la dose constitue un paramètre clef dans la sévérité des dommages. Il a par exemple été montré que le pourcentage d'animaux développant des lésions intestinales radio-induites chroniques est de 0 dans un modèle d'entérite radique chez le rat pour une dose de 18 Gy. En revanche, ce pourcentage atteint 91% lorsque la dose s'élève à 24 Gy dans ce même modèle (Langberg et al. 1992). L'irradiation dose unique est un modèle à forte composante conséquentielle et la dose totale doit donc être assez forte pour générer des lésions aiguës non cicatrisées et évoluant vers une fibrose tardive (Dorr et al. 2001). La non cicatrisation des lésions précoces implique également que le volume de tissu irradié soit suffisant. Skwarchuk et al ont démontré qu'il existe une longueur seuil de colorectum irradié chez la souris C3Hf/Kam (C3H) nécessaire pour générer des lésions tardives. Ainsi, en dessous d'un seuil de 10 mm de long irradié à 32 Gy, l'épithélium est capable de se régénérer depuis les marges saines et les lésions précoces cicatrisent, il n'y a donc pas de dommages tardifs. En revanche,

à partir de 20 mm, l'épithélium ne peut plus cicatriser et des lésions tardives de type obstruction intestinale se développent (Skwarchuk et al. 1998b). Lors de la mise au point du modèle au L3R, une fenêtre de 10 mm de long pour une dose de 27 Gy s'est avérée suffisante pour obtenir des lésions tardives chez la souris C57Bl6.

Le modèle d'irradiation colorectale utilisé au L3R a été mis au point chez un modèle de souris C57Bl/6 (B6). Par contre, ce projet de thèse a nécessité l'utilisation de souris Tie2-GFP, possédant un fond génétique différent (FVB), qui pouvait modifier les lésions tissulaires obtenues en comparaison au modèle standard B6. En effet, des études ont pu mettre en évidence une variation de la sévérité des lésions colorectales radio-induites en fonction du fond génétique des animaux. Il a par exemple été montré que pour une même dose d'irradiation, la souche B6 apparaît plus sensible que la souche C3H dans un contexte de fibrose intestinale radio-induite (Skwarchuk et al. 1998a). Cependant, bien que les souris B6 présentent des lésions histologiques plus sévères et précoces au regard de celles observées chez les C3H, aucune différence n'a été constatée concernant l'expression génétique des principales cytokines profibrotiques à savoir le TGF- $\beta$ 1, 2, 3 et du TNF- $\alpha$ . Ceci suggère entre autres que la différence dans l'expression des dommages radio-induits et de la fibrose entre ces deux souches n'est pas dépendante de l'expression de ces cytokines pro-inflammatoires. Il est à noter que ces variations apparaissent également dans d'autres modèles de fibrose non radio-induite et sont fonction du type d'organe étudié. Walkin *et al* ont par exemple résumé les susceptibilités génétiques d'une dizaine de souches de souris à développer différentes fibroses tissulaires (rénale, cardiaque, pulmonaire et intestinale entre autres). Ainsi, ces auteurs ont mis en lumière que le fond génétique FVB/N s'avère réfractaire au développement d'une fibrose hépatique en comparaison aux souris B6 et BALB/c (Walkin et al. 2013). Dans notre contexte d'étude, l'analyse histologique des lésions colorectales aiguës et chroniques obtenues chez les souris FVB/N n'a pas révélé de différence avec celles observées chez les souris B6. Le fond génétique FVB/N ne semble donc pas impacter la sévérité des dommages colorectaux radio-induits et constitue donc un modèle valide pour notre étude.

En tenant compte de l'ensemble de ces observations, le choix de la dose unique de 27 Gy apparaît donc être un protocole adapté pour obtenir une fibrose radio-induite chez la souris. La faible taille de tissu irradié permet de délivrer une forte dose qui engendre des dommages suffisants pour observer l'installation de la fibrose transmurale.

### 3. Caractéristiques du modèle Tie2-GFP et mise en évidence de l'EndoMT

La stratégie mise en place pour identifier l'EndoMT *in vivo* s'est basée sur l'utilisation de souris exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur endothélial spécifique Tie2 (Motoike et al. 2000). Ainsi, il a été possible de suivre le changement phénotypique des cellules endothéliales vers un phénotype mésenchymateux-like (co-marquage de la GFP et de l' $\alpha$ -SMA) après une irradiation colorectale.

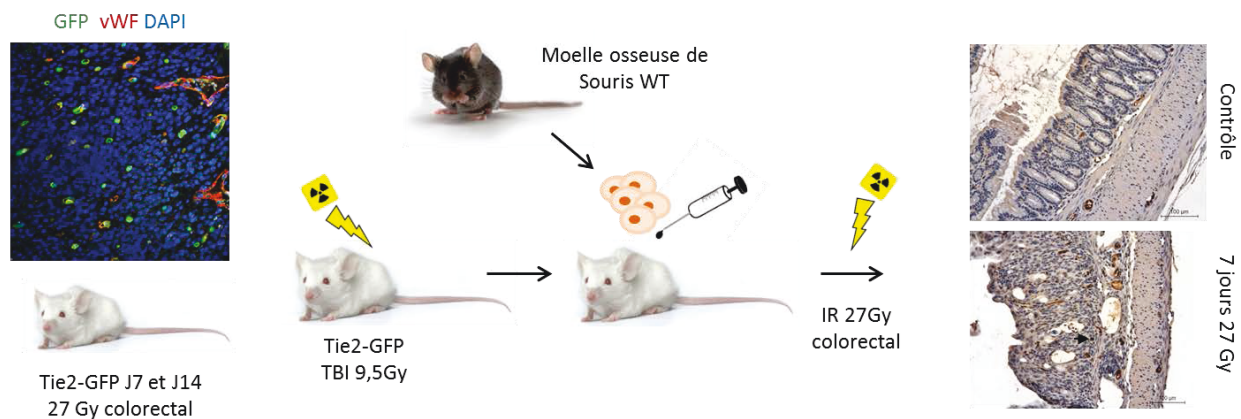
En conditions physiologiques, le système Tie fait intervenir deux récepteurs de type tyrosine kinase, Tie1 et Tie2, qui après fixation de leurs ligands, les angiopoïétines, participent à la régulation de l'angiogenèse et au maintien de l'homéostasie endothéliale (Jones et al. 2001). L'expression de Tie1 et Tie2 est détectée de manière précoce au niveau de l'endocarde au cours du développement embryonnaire chez la souris (8<sup>ème</sup> jour embryonnaire) et cette expression est également observée dans les cellules endothéliales vasculaires matures (Sato et al. 1993; Schnurch et al. 1993). De fait, ces gènes sont identifiés comme étant des marqueurs endothéliaux stables. A ce propos, le suivi de l'expression de Tie2 a permis de confirmer l'existence de l'EndoMT dans un contexte physiologique au niveau des valves cardiaques chez la souris (Kisanuki et al. 2001), et également dans des contextes de fibrose tissulaire et dans la démonstration de l'origine endothéliale des CAF (Zeisberg et al. 2007a; Zeisberg et al. 2008). L'ensemble de ces résultats vient donc appuyer l'intérêt de ce modèle et la pertinence de son utilisation dans la mise en évidence de l'EndoMT radio-induite. Nos résultats ont permis de révéler pour la première fois l'existence de l'EndoMT dans un modèle pré-clinique de rectite radique.

L'EndoMT étant caractérisée par l'acquisition d'un phénotype migratoire *in vitro*, nous avons par la suite analysé la localisation des cellules en transition dans notre modèle de rectite radique. De manière intéressante, aucune cellule en EndoMT n'a été observée en dehors des vaisseaux contrairement à d'autres modèles de fibrose rénale, pulmonaire et intestinale (Hashimoto et al. 2010; Rieder et al. 2011; LeBleu et al. 2013). Ceci suggère que l'expression de Tie2 pourrait diminuer au fur et à mesure que les cellules endothéliales se transdifférencient et migrent dans le tissu, et que la faible intensité du marquage GFP soit masquée par l'intensité du marquage  $\alpha$ -SMA. Nous avons donc effectué un marquage de la GFP seule dans les tissus les plus lésés et fibrosés. Nos résultats ont pu révéler la présence de

cellules allongées GFP positives présentes dans le tissu conjonctif suggérant la présence de cellules mésenchymateuses d'origine endothéliale pouvant prendre part au développement de la fibrose digestive radio-induite. La synthèse des connaissances actuelles permet donc de considérer le modèle Tie2-GFP comme une valeur sûre dans l'étude du suivi du phénotype endothélial. De plus, ce modèle est couramment utilisé pour identifier l'EndoMT *in vivo*. Néanmoins, l'existence de limites concernant l'expression du promoteur Tie2 est à prendre en considération.

La spécificité du promoteur Tie2 a en effet été remise en cause suite à la mise en évidence de son expression par d'autres types cellulaires. De Palma *et al* ont notamment pu montrer que l'expression de Tie2 caractérise trois populations cellulaires distinctes, à savoir les cellules hématopoïétiques et myéloïdes/monocytaires (CD45<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD19<sup>-</sup>), les précurseurs des péricytes et certains leucocytes, dans un contexte d'angiogenèse pro-tumorale (De Palma *et al.* 2003; De Palma *et al.* 2005). De plus, nous avons observé la présence de cellules GFP<sup>+</sup> de petite taille, rondes, en grand nombre au sein de l'infiltrat et impossible à discriminer des CE des microvaisseaux. Ces cellules GFP<sup>+</sup> pourraient correspondre à ces progéniteurs. Nous avons donc mis en place une stratégie d'extinction de la GFP dans la moelle osseuse, afin de supprimer les progéniteurs hématopoïétiques GFP<sup>+</sup> provenant de la moelle, dans le tissu irradié. Pour cela, les souris Tie2-GFP ont été exposées à une dose de 9,5 Gy TBI afin de dépléter la moelle, puis ont reçu une greffe de moelle provenant de souris B6 (GFP<sup>-</sup>) (**Figure 35**). Les résultats obtenus ont permis de montrer que l'extinction de la moelle n'a pas d'influence sur le nombre de cellules GFP<sup>+</sup> dans le tissu irradié. Ceci confirme que le recrutement des progéniteurs de la moelle représente une quantité minime de cellules GFP<sup>+</sup> dans notre modèle de rectite radique. Toutefois, du fait de la localisation, la taille et la forme de ces cellules isolées, ces dernières pourraient correspondre à des lymphocytes. Il serait intéressant d'effectuer des co-marquages de la GFP avec des marqueurs de la lignée lymphoïde tels que le CD4, CD8 ou CD11b pour mieux caractériser ces cellules isolées. Pendant un temps, l'expression de Tie2 était considérée comme homogène dans l'ensemble de l'arbre vasculaire. Cependant, les travaux d'Anghelina *et al* ont révélé que le promoteur Tie2 possède une activité préférentielle pour l'endothélium artériel microvasculaire (Anghelina *et al.* 2005). De manière surprenante, leurs résultats ont montré, via l'utilisation du modèle Tie2-GFP, que la GFP est exprimée seulement par la moitié des microvaisseaux mésentériques

dans ce modèle. L'analyse de l'intensité de la fluorescence de la GFP a permis de définir un ordre d'expression préférentiel de Tie2 comme suit : dans les artères > les artérioles > les veines > les veinules. Ces résultats ont par ailleurs été confirmés dans un modèle de souris exprimant le reporteur LacZ sous le contrôle de Tie2, où la  $\beta$ -galactosidase possède un marquage en mosaïque dans le compartiment veineux. Ceci suggère que l'évaluation de la fréquence de l'EndoMT radio-induite est certainement sous-estimée dans notre modèle préclinique. Une manière de s'affranchir de cette contrainte serait de suivre le devenir des CE via l'expression d'un autre promoteur endothélial, tel que la VE-cadhérine (Cdh5), comme utilisé dans l'étude de LeBleu *et al*, et d'analyser la fréquence de l'EndoMT radio-induite dans ce modèle de souris Cdh5-YFP (Yellow Fluorescent Protein) (LeBleu *et al.* 2013). Cependant, l'utilisation de ce modèle est contestable du fait de la baisse d'expression de la VE-cadhérine observée dans la majorité des études portant sur l'EndoMT. De ce fait, quel que soit le modèle envisagé pour l'étude de l'EndoMT *in vivo*, la présence de limites caractéristiques est à prendre en considération et ne permettent pas d'identifier un modèle idéal pour l'étude de ce phénomène. Néanmoins, le modèle Tie2-GFP rassemble un certain nombre d'avantages et reste un outil fiable dans l'étude de l'EndoMT *in vivo*.



**Figure 35 :** Etude la spécificité du modèle Tie2-GFP : extinction de la GFP par greffe de moelle osseuse. Déplétion de la moelle de souris Tie2-GFP par irradiation corps entier ou TBI de 9,5 Gy, suivie d'une greffe de moelle de souris C57Bl/6 24h post-irradiation. Modélisation de la rectite radique par irradiation colorectale en dose unique de 27 Gy, 6 à 7 semaines post-greffe. Evaluation du recrutement cellulaire de la moelle vers le tissu irradié par marquage immunohistochimique de la GFP, 7 jours post-irradiation.

#### 4. Caractérisation de l'EndoMT *in vitro* : les HIMECs un modèle optimal

Concernant les HIMECs, ces cellules ont été extraites à partir de muqueuse colique humaine (résections chirurgicales saines, patients de la Clinique de Cleveland, USA), selon le protocole décrit par Binion *et al*, (voir **Annexe 5**) (Binion *et al.* 1997). L'utilisation de cellules endothéliales de veines de cordons ombilicaux humains (HUVECs) est très fréquente pour étudier le phénotype vasculaire, choix qui se justifie avant tout par l'apport d'un certain confort expérimental (facilité de culture). Bien que ce modèle permette l'identification de mécanismes cellulaires et moléculaires novateurs, il est important de rappeler l'existence d'une hétérogénéité phénotypique endothéliale (différences structurelle, du profil d'expression génique et fonctionnelle) qui est fonction de la taille des vaisseaux et de l'origine tissulaire des CE (Aird 2003). En ce sens, l'utilisation d'HIMECs semblaient être le modèle cellulaire idéal dans l'étude de l'EndoMT radio-induite dans un contexte de fibrose digestive, avec un reflet du comportement endothélial proche de celui observé chez les patients après radiothérapie. Un certain nombre de données semblent prometteuses quant à la capacité des rayonnements ionisants à induire l'EndoMT chez les HIMECs. Les travaux d'Otterson *et al* ont par exemple révélé que l'irradiation induit l'apoptose des HIMECs, une augmentation de la production de ROS, la formation de fibres de stress et favorise la diminution de la migration cellulaire *in vitro*. L'utilisation d'un agent mimétique de la SOD (EUK-207) confère une protection des HIMECs vis-à-vis de l'irradiation, confirmant que les rayonnements ionisants favorisent la formation d'un microenvironnement oxydant (Otterson *et al.* 2012). Les travaux de Rieder *et al* ont démontré que l'exposition des HIMECs à des cytokines pro-inflammatoires recombinantes favorise la transition des cellules vers un phénotype mésenchymateux (Rieder *et al.* 2011). Les HIMECs réagissent donc aux rayonnements comme un grand nombre de CE et sont capables d'acquérir un phénotype mésenchymateux sous stimulus inflammatoire. Il était donc probable que les HIMECs irradiées démontrent un switch phénotypique vers un phénotype mésenchymateux. Les données sur l'EndoMT radio-induite sont très peu nombreuses et très récentes. Frid *et al* ont démontré pour la première fois la capacité des CE vasculaires bovines matures à acquérir un phénotype de CMLs *in vitro*. De manière intéressante ces auteurs ont utilisé l'irradiation forte dose (30 Gy, rayon  $\gamma$ ) pour stopper la prolifération cellulaire, et ont ainsi pu montrer que



l'acquisition du phénotype d'EndoMT est indépendante de la prolifération cellulaire. Bien que ces auteurs n'aient pas précisé si cette irradiation avait un impact sur le nombre de cellules en EndoMT, cette étude reste la première référence révélant la présence de l'EndoMT après irradiation (Frid et al. 2002). Les travaux de Kim *et al* menés en 2013, ont été les premiers à mettre en lumière le lien entre l'irradiation et le phénomène d'EndoMT dans un contexte d'athérosclérose. *In vitro*, ces auteurs ont pu montrer (i) que l'irradiation induit l'EndoMT dans les cellules endothéliales aortiques humaines ; (ii) la présence de LDL oxydés (acteurs majeurs dans la formation des plaques d'athérome), accélère l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux par les CE irradiées ; (iii) un certain nombre de cellules mésenchymateuses retrouvées au niveau des plaques d'athérome radio-induites possèdent une origine endothéliale dans un modèle de souris déficientes en apolipoprotéine E (apo E<sup>-/-</sup>) (Kim et al. 2013). L'ensemble de ces résultats vient donc conforter notre intérêt dans l'étude de l'EndoMT radio-induite et ses conséquences sur le développement de la fibrose digestive.

D'un point de vue expérimental, plusieurs inconnues se sont présentées au début de cette étude notamment quant à la dose et la durée de culture nécessaires pour recréer un contexte favorable à l'EndoMT *in vitro*. C'est pourquoi nous avons choisi d'exposer les HIMECs à plusieurs doses (0, 2, 10 et 20 Gy) et de les étudier à différents temps après irradiation (3, 7, 14 et 21 jours). Ainsi, nous avons pu observer un effet dose-dépendant de l'induction de l'EndoMT radio-induite et déterminer que le temps de 7 jours après une exposition de 10 Gy était favorable à l'initiation de ce phénomène. Il serait par ailleurs intéressant d'appuyer ces précédentes observations dans un modèle *in vitro* d'irradiation fractionnée. Concernant les profils d'expression génique/protéique des HIMECs irradiées, nous avons observé une importante augmentation des marqueurs mésenchymateux  $\alpha$ -SMA, et SM22 $\alpha$  ainsi qu'une diminution significative du facteur vWF, caractérisant le processus d'EndoMT radio-induit. De manière intéressante, nous avons également noté une diminution de l'expression du marqueur endothélial Tie1, dont la perte d'expression est suffisante pour induire l'EndoMT *in vitro* (Garcia et al. 2012). Cependant, contrairement à d'autres études, nous n'avons pas observé de diminution de l'expression du CD31 ou de la VE-cadhérine dans le contexte de l'irradiation (Hashimoto et al. 2010; Choi et al. 2015; Ranchoux et al. 2015). Ceci peut s'expliquer par l'existence d'une hétérogénéité phénotypique des cellules en EndoMT. En effet, comme explicité en introduction de ce manuscrit, l'EndoMT est définie

comme une évolution globale du programme protéique qui débute par la perte de l'expression de marqueurs caractéristiques des CE vers l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux-like. De plus, la nature de l'agent inducteur ainsi que de l'origine tissulaire des CE constituent des paramètres qui participent grandement à l'initiation de ce phénomène. Paruchuri *et al* ont par exemple observé que des clones de CE microvasculaires dermiques humaines (HDMECs) provenant de différents patients, ne rentrent pas tous en programme d'EndoMT après stimulation au TGF- $\beta$ 2, suggérant l'importance de facteurs intrinsèques. De plus, leurs travaux ont montré que les HDMECs semblent plus réfractaires à rentrer en EndoMT en comparaison avec des CE pulmonaires soulignant l'importance de l'origine tissulaire des CE (Paruchuri *et al.* 2006). De la même manière, certains travaux démontrent l'induction de l'EndoMT par le TGF- $\beta$ 1 (HIMECs) (Rieder *et al.* 2011), alors que d'autres n'observent pas ce phénomène chez les HUVECs (Maleszewska *et al.* 2013), ou dans un contexte de sarcome de Kaposi associé au virus de l'herpès (KSHV), dans lequel l'EndoMT est initiée par la voie canonique Notch (Gasperini *et al.* 2012). Il existe donc une lacune quant à l'influence des facteurs intrinsèques et environnementaux sur l'activation de l'EndoMT.

Concernant la plasticité endothéliale, les travaux de Medici *et al* ont été novateurs dans ce domaine et ont mis en évidence que la conversion des CE en cellules mésenchymateuses implique le passage par un stade multipotent caractéristique des CSM dans un contexte d'ossification ectopique (FOP) (Medici *et al.* 2010; Medici *et al.* 2012). L'existence de cet état souche avait été observé auparavant en conditions physiologiques, où une population de cellules interstitielles valvulaires (CIVs, acteurs principaux de l'EndoMT embryonnaire) présentaient un phénotype similaire à celui des CSM (Latif *et al.* 2007). D'autres travaux viennent étayer ces précédentes observations et ont pu montrer que ces CIV possèdent un potentiel de différenciation multiple et participent à la calcification des valves via leur différenciation en précurseurs ostéoblastiques (Wylie-Sears *et al.* 2011). Toutefois, il est à noter que la caractérisation de ce phénotype souche est récente et il existe donc un manque de données concernant les conditions favorables à son initiation. De plus, ce phénotype n'est pas observée dans l'ensemble des travaux étudiant l'EndoMT (Gasperini *et al.* 2012). En prenant en considération ces informations, nous nous sommes donc intéressés à déterminer si l'irradiation pouvait favoriser le passage vers un état souche dans notre modèle d'EndoMT *in vitro*. De façon globale, le profil d'expression des marqueurs de CSM et

progéniteurs endothéliaux choisis dans notre étude n'est pas modifié après irradiation. De façon intéressante nous avons observé l'augmentation de l'expression du CD34. Il s'agit d'une glycoprotéine exprimée par plusieurs populations cellulaires dont les progéniteurs et cellules hématopoïétiques, les progéniteurs fibroblastiques embryonnaires, les progéniteurs endothéliaux circulants, en revanche il n'est pas exprimé par les CSM (Sidney et al. 2014; Kobolak et al. 2015). Ceci écarte donc l'hypothèse d'un passage à l'état CSM-like des HIMECs après irradiation dans nos conditions. Au niveau morphologique, les HUVECs CD34<sup>+</sup> correspondent à une sous-population de cellules d'aspect allongé (présence d'extensions polarisées localisées sur une extrémité), possédant des propriétés d'adhésion et de migration semblables aux « tip cells » impliquées dans l'angiogenèse *in vivo* (Siemerink et al. 2012). Le CD34 est considéré comme le gardien de la plasticité cellulaire, et sa surexpression pourrait favoriser l'EndoMT et l'acquisition d'un phénotype migratoire. Dans ce contexte, il serait intéressant de caractériser les cellules CD34<sup>+</sup> dans notre modèle et de déterminer (i) si les cellules en EndoMT correspondent aux cellules CD34<sup>+</sup>; (ii) si les cellules en EndoMT expriment d'autres marqueurs de cellules immatures tels que le CD117, le CD133 et le VEGFR-2, marqueurs caractéristiques de progéniteurs endothéliaux circulants (Peichev et al. 2000).

Les résultats de notre étude ont donc permis de mettre en évidence la capacité des rayonnements ionisants à induire l'EndoMT dans un modèle de CE microvasculaires. Ces premiers résultats ouvrent le champ d'étude vers des perspectives attrayantes notamment concernant la caractérisation des cellules en EndoMT après irradiation. L'étude de la mobilité cellulaire, du pourcentage de cellules en transition sont tout autant de paramètres qui restent à être déterminés dans ce modèle d'EndoMT radio-induite *in vitro*. De plus, le cil primaire présent à la surface des CE semble également jouer un rôle dans l'initiation de l'EndoMT via l'induction de la voie TGF- $\beta$ /ALK-5 *in vivo*, dans un contexte de stress induit pas des forces de cisaillement (Egorova et al. 2011). L'étude de l'expression de ce cil endothélial à la surface des HIMECs après irradiation pourrait constituer une nouvelle voie de recherche dans la compréhension des mécanismes impliqués dans l'activation de l'EndoMT.

## 5. Recherche d'une cible moléculaire de l'EndoMT radio-induite

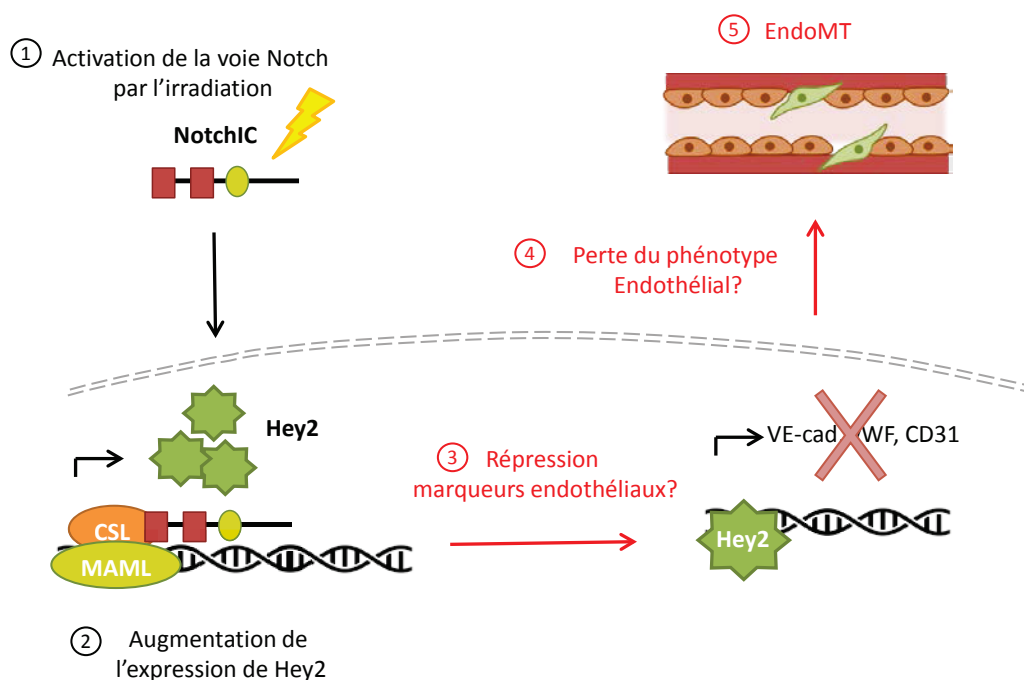
Comme abordé de manière détaillée dans le chapitre 5 de ce manuscrit, l'activation de la voie Notch fait partie intégrante des mécanismes impliqués dans l'induction de l'EndoMT, aussi bien dans un contexte physiologique que pathologique. Par ailleurs, le nombre d'études démontrant l'effet bénéfique de l'inhibition de cette voie dans la réduction de l'EndoMT et de manière générale, dans la réduction de la fibrose ne cesse d'augmenter et souligne l'intérêt thérapeutique de la suppression de ce phénomène (Zhou et al. 2015).

Les gènes codant pour les facteurs de transcription Hesr/Hey sont identifiés comme les principaux effecteurs de la voie Notch. Nous avons émis l'hypothèse que l'EndoMT radio-induite Notch-dépendante pourrait faire intervenir l'expression de ces facteurs, et que l'inhibition de ces derniers pourrait constituer une base d'étude dans l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques. Cette hypothèse est appuyée par certains travaux qui ont pu mettre en évidence une surexpression de Hey2 dans un contexte d'EndoMT dépendante de Notch (Fu et al. 2011; Gasperini et al. 2012), soulignant l'intérêt de l'étude de ce facteur dans le contexte de l'EndoMT radio-induite. De plus, la voie Notch étant impliquée dans la régulation de nombreuses voies de signalisation cruciales au fonctionnement cellulaire, l'identification de cibles situées en aval des récepteurs Notch constitue une approche d'intérêt afin de limiter les effets dus à une invalidation de cette voie. C'est pourquoi, les gènes cibles Hesr/Hey, surexprimés, apparaissent être des cibles privilégiées dans l'inhibition de l'EndoMT et la réduction de la pathologie fibrotique chez les patients (**Figure 36**).

Concernant la stratégie expérimentale mise en œuvre, nous avons choisi d'utiliser pour cette partie du projet des HUVECs dont l'expression génique et protéique a été évaluée 7 jours après une exposition à 10 Gy. Ce choix de modèle cellulaire se justifie avant tout par la faible quantité d'HIMECs disponibles au laboratoire au moment de l'étude et de ce fait, une certaine limite dans la quantité de cellules disponibles pour la mise au point des protocoles de transfection (siRNA et plasmides) nécessaires afin de moduler l'expression de Hey2. De plus, il existait une inconnue quant à la fragilité éventuelle des HIMECs vis-à-vis de ce type de transfection. C'est pourquoi l'utilisation d'HUVECs nous a permis dans un premier temps de caractériser les modifications cellulaires radio-induites et notamment d'étudier l'expression de Hey2 après irradiation. A ce propos, les premiers résultats obtenus *in vitro* nous ont permis

d'apprécier une augmentation de l'expression du facteur Hey2 ainsi qu'une diminution de l'expression de Hey1 chez les HUVECs, 7 jours après une irradiation de 10 Gy (**Article n°2**). Ces résultats nous ont également permis de montrer que l'irradiation induit l'EndoMT dans un autre type cellulaire, et d'autre part, que la nature des CE n'influence pas l'activation du processus d'EndoMT radio-induite dans nos conditions. Au vue de ces résultats, nous avons décidé de concentrer nos travaux sur le rôle de Hey2 dans l'induction de l'EndoMT radio-induite. La stratégie mise en place a consisté à effectuer des variations d'expression génique de Hey2 dans les HUVECs, et également d'inactiver ce gène dans un modèle de souris via une approche de délétion génétique. De par la létalité embryonnaire causée par la délétion totale du gène Hey2 (souris Hey2<sup>-/-</sup>) ([Sakata et al. 2002](#); [Kokubo et al. 2013](#)), et parce que nous souhaitions étudier le rôle de Hey2 dans les CE, nous avons choisi de générer un modèle de souris présentant une déficience conditionnelle pour Hey2 spécifiquement dans le compartiment endothélial, ceci via l'utilisation de la transgénèse ciblée. En effet, l'utilisation de la technologie Cre-loxP apparaît comme un outil robuste nous permettant de déterminer le rôle de Hey2 au sein du système vasculaire, et son implication dans l'évolution des dommages radio-induits aux tissus sains au niveau du tube digestif. Ainsi, le protocole établi pour générer ce modèle transgénique a nécessité le croisement d'une première souche de souris possédant une version floxée du gène Hey2 (Hey2<sup>flx/flx</sup>, **Annexes 6 et 7**), avec une seconde souche de souris exprimant la Cre recombinase sous l'expression du promoteur de la VE-cadhérine, souris VEcad-Cre (**Annexe 7**). Nous avons privilégié le promoteur de la VE-cadhérine dans ce modèle pour deux principales raisons. Tout d'abord, parmi les cinq lignées de souris Cre endothelium-spécifique disponibles (Tie1, Tie2, PECAM, Flk-1, VE-cadhérine), la lignée VE-cadhérine semble être la plus spécifique du compartiment endothélial. Le second argument en faveur de ce modèle concerne la stabilité de l'activité de la VE-cadhérine au cours du temps. Détectée à la fois de manière précoce (dès 7,5 jours embryonnaire) elle est également exprimée de façon uniforme dans l'ensemble du réseau vasculaire à l'âge adulte, y compris dans les cellules quiescentes ([Alva et al. 2006](#)). Le croisement de cette souche de souris VEcad-Cre avec la souche Hey2<sup>flx/flx</sup> a donc permis de générer un modèle de souris déficientes pour Hey2 spécifiquement dans le compartiment endothélial (souris Hey2 KO<sup>endo</sup>). Malgré la puissance et la fiabilité de ce système de recombinaison site-spécifique, ce dernier présente toutefois certaines limites. Le principal biais de ce modèle concerne l'expression de la Cre. En effet, une activité tissulaire de la Cre imprévue ou inexpliquée peut être observée

dans certains modèles comme par exemple dans des modèles de souris exprimant la Cre sous le contrôle des promoteurs Thy1, Grik4, GFAP et Cyp39a1 (Heffner et al. 2012). Ceci peut s'expliquer par une expression ectopique du transgène de la Cre due à l'expression non connue ou anticipée de son promoteur. Ceci peut également être dû à des perturbations de la régulation du gène en lui-même. En effet, la plupart des modèles expriment la Cre sous le contrôle de la partie proximale du promoteur d'un gène donné, de ce fait il peut exister une modification des sites de régulation du promoteur (action des activateurs ou des répresseurs perturbée) conduisant à des variations inhabituelles de son expression. Ce biais est donc à prendre en considération dans l'interprétation des résultats. Néanmoins, l'utilisation du modèle VEcad- Cre est fréquente au laboratoire et a déjà démontré sa fiabilité à travers la création de plusieurs modèles transgéniques, à savoir des modèles déficients pour les gènes PAI-1 et HIF-1 $\alpha$  spécifiquement dans l'endothélium vasculaire. De plus, la spécificité des événements de recombinaison endothélium spécifique (promoteur de la VE-cadhérine), a été étudiée dans une souche de souris VEcadh-LacZ où un marquage de la  $\beta$ -galactosidase a été observé uniquement dans le système vasculaire (Rannou et al. 2015).



**Figure 36 :** Hypothèse du rôle de Hey2 dans l'induction de l'EndoMT radio-induite. ① Activation de la voie Notch et translocation nucléaire de NotchIC ; ② Transcription des gènes cibles Hes-Hey, surexpression de Hey2 ; ③ Inhibition de l'expression des marqueurs endothéliaux Hey2-dépendante ; ④ Perte du phénotype endothélial ; ⑤ Initiation de l'EndoMT.



Concernant l'irradiation appliquée dans ce modèle d'irradiation colorectale, nous avons choisi de réduire la dose initiale de 27 Gy à 22 Gy. La principale raison expliquant cette modification concerne le changement du dispositif d'irradiation au cours de cette étude, passant d'une source de cobalt (rayons  $\gamma$ ) à un accélérateur linéaire de particules (rayons X). La sévérité des dommages tissulaires engendrés par l'accélérateur linéaire pour une dose de 27 Gy s'est avérée plus importante qu'avec la source de cobalt, et associée avec une augmentation de la létalité des animaux. De plus, nous souhaitons étudier dans un premier temps, l'effet de la délétion conditionnelle de Hey2 sur la phase inflammatoire de la pathologie, c'est pourquoi une dose plus faible était suffisante. L'analyse histologique des souris Hey2 KO<sup>endo</sup> a permis de révéler que la délétion conditionnelle de Hey2 dans le compartiment endothélial réduit de façon significative la sévérité de l'atteinte tissulaire, le dépôt muqueux d' $\alpha$ -SMA et la fréquence de l'EndoMT pour un temps précoce après irradiation (14 jours), avec une réduction de la perte de l'épithélium bordant. Ces résultats viennent donc valider notre hypothèse quant au rôle potentiel de Hey2 dans l'induction de l'EndoMT radio-induite associée aux dommages tissulaires mais surtout, le rôle de l'EndoMT dans le développement des lésions radio-induites. Ces résultats sont encourageants et d'autres expériences sont en cours afin de préciser si cette délétion endothéliale-spécifique de Hey2 pourrait également influencer l'évolution des dommages chroniques de type fibrose radio-induite chez ces animaux. L'étude *in vitro* permettra de confirmer si l'invalidation/ la surexpression de Hey2 influence l'expression des marqueurs mésenchymateux dans les HUVECs après irradiation et de fait, préciser la place de Hey2 dans le processus d'EndoMT radio-induite.

L'état actuel des connaissances concernant les facteurs de transcription Hesr/Hey permet d'associer leur expression avec l'activation de la voie Notch. Par ailleurs, l'activité de cette voie influence une multitude de paramètres cellulaires dont la prolifération, la différenciation, ainsi que le maintien d'un stade immature, notamment observé au sein des compartiments souches des cryptes intestinales. De façon intéressante, nous avons observé une reprise glandulaire associée à la présence de cryptes hyperplasiques dans notre modèle de souris Hey2 KO<sup>endo</sup> après irradiation. Il serait donc intéressant d'étudier par la suite si la délétion endothéliale de Hey2 pourrait influencer/stimuler la prolifération des cellules épithéliales. L'analyse de marqueurs de prolifération tels que le Ki67 ou le BrdU permettrait

d'apporter un élément de réponse quant à l'impact de la délétion endothéliale de Hey2 sur le compartiment épithélial. Enfin, parmi les autres mécanismes régulés par cette voie, la sénescence cellulaire est corrélée avec l'activation de Notch. En effet, Venkatesh *et al* ont pu montrer un lien entre l'activation de Notch1 et de ses effecteurs Hes1, Hey1 et Hey2 et l'expression de marqueurs de sénescence ( $\beta$ -galactosidase), aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Venkatesh *et al.* 2011). Des résultats similaires ont été obtenus concernant l'expression du facteur de transcription Hes1 (activation de la voie Notch), dans un contexte de sénescence associée aux pathologies cardiovasculaires, chez la souris et l'homme (Liu *et al.* 2012). Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives de recherche quant à l'implication des facteurs Hesr/Hey dans la sénescence cellulaire radio-induite.

## 6. Perspectives de recherche sur l'EndoMT radio-induite : la protéine mTOR

Comme nous l'avons vu tout au long de ce manuscrit, l'activation endothéliale, l'apoptose et la mort clonogénique font partie des principales réponses cellulaires observées après irradiation. En plus de ces mécanismes, les cellules en prolifération peuvent enclencher, en réponse à un stress (ROS, rayonnements ionisants, activation d'oncogènes), un arrêt permanent et irréversible du cycle cellulaire faisant référence au processus de **sénescence prématurée induite par le stress (SPIS)**. En physiologie, la sénescence est associée au vieillissement cellulaire qui est caractérisé par un raccourcissement graduel des télomères opérant à chaque division cellulaire, due à l'incapacité des polymérases répliquatives à synthétiser de l'ADN aux extrémités des chromosomes, on parle dans ce cas de **sénescence répliquative (SP)**. La sénescence a pendant longtemps été considérée comme un état de « dormance » au cours duquel la cellule perdait sa capacité de réplication, de différenciation, ainsi que ses capacités fonctionnelles caractéristiques, sans connaissance de l'impact réel d'un tel phénotype sur les cellules avoisinantes. Or, nous savons aujourd'hui que la sénescence est un processus dynamique et complexe dans lequel les cellules sénescents (CS) influencent directement une multitude de paramètres biologiques déterminants. En effet, une sénescence observée de manière ponctuelle joue un rôle bénéfique dans la suppression tumorale, favorise la cicatrisation et limite le dépôt de MEC en favorisant la dégradation cellulaire par le système immunitaire. Paradoxalement, la sénescence prolongée est quant à elle associée avec le

développement de maladies liées à l'âge, de cancers et prend également part au développement de pathologies fibrotiques (Clements et al. 2013; Burton et al. 2014). Trois caractéristiques principales des CS peuvent expliquer leur impact néfaste sur le devenir tissulaire, tout d'abord (i) leur incapacité à proliférer peut impacter la régénération tissulaire ; (ii) la dysfonction cellulaire empêche les CS d'assurer leurs fonctions biologiques ; (iii) les CS sont capables de modifier la composition de leur microenvironnement via leur sécrétome actif particulier défini par le SASP (Senescence-Associated Secretory Phenotype) essentiellement composé de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 $\beta$ , IL-6), de chimiokines (IL-8), de facteurs de croissance (G-SCF, bFGF) et de protéases (MMP et PAI-1) (Coppe et al. 2008).

Ajouté à cela, il existe une accumulation de données qui permettent aujourd'hui de relier ce phénomène à l'irradiation aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. En effet, plusieurs travaux s'accordent à démontrer le rôle de l'irradiation dans l'acquisition d'un phénotype sénescents dans divers modèles de CE *in vitro* (Oh et al. 2001; Igarashi et al. 2007; Panganiban et al. 2013). Igarashi *et al* ont par exemple montré que 80 à 90% des CE (BAECs et HUVECs) deviennent sénescents 3 à 5 jours après une exposition de 8 Gy (Igarashi et al. 2007). Panganiban *et al* ont quant à eux révélé, sur CE artérielles pulmonaires, que le processus de sénescence précède l'apoptose endothéliale radio-induite *in vitro*, pour des doses comprises entre 2 et 50 Gy (Panganiban et al. 2013). De manière intéressante, une autre étude a pu mettre en relation le processus de sénescence répllicative avec l'EndoMT *in vitro*. Dans ce modèle, la culture prolongée et l'accumulation de passages de CE aortiques humaines favorisent l'acquisition d'une morphologie allongée de type fibroblaste. Ceci se traduit au niveau génique par une augmentation de l'expression de marqueurs mésenchymateux tels que l' $\alpha$ -SMA, le TGF- $\beta$ , le collagène I par les CE (Fleenor et al. 2012). Enfin, nous avons également observé dans nos modèles d'EndoMT radio-induite, aussi bien pour les HIMECs que pour les HUVECs, que ces cellules adoptaient une morphologie aplatie, élargie et granuleuse caractéristique des CS, 7 jours après une irradiation de 10 Gy. Ainsi, l'ensemble de ces résultats nous ont amené aux questionnements suivants: l'EndoMT radio-induite constitue-t-elle une forme de sénescence et existe-il des liens moléculaires permettant de relier ces deux mécanismes ? Ces questions ont notamment fait l'objet d'un projet de master 2 que j'ai eu l'opportunité d'encadrer, avec l'obtention de premiers résultats intéressants.

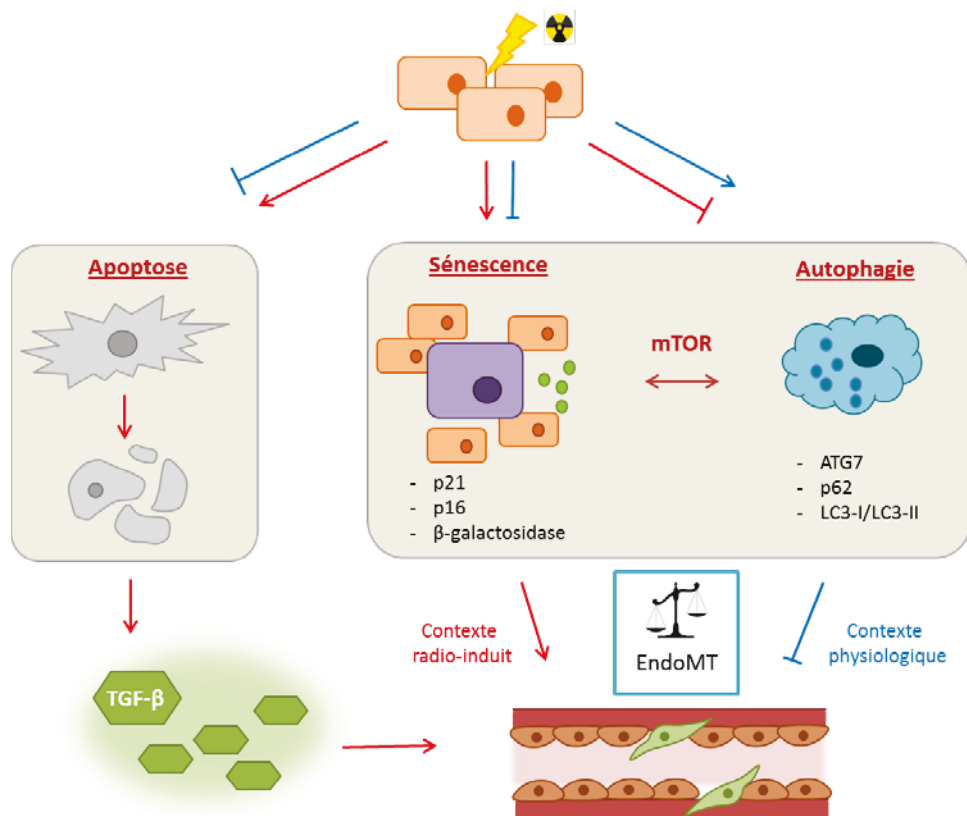
L'analyse de l'expression de marqueurs de sénescence dans notre modèle d'EndoMT radio-induite *in vitro* nous a permis de constater une augmentation de l'activité  $\beta$ -galactosidase ainsi que l'expression de marqueurs de sénescence (p21<sup>Waf1</sup>, p16<sup>Ink4a</sup>, p53). Par la suite, la réalisation de co-marquages (marqueurs mésenchymateux/ sénescence) a révélé que les CE en EndoMT étaient positives pour l'ensemble de ces marqueurs de sénescence soutenant ainsi notre hypothèse de départ. Ces premiers résultats sont encourageants et doivent être précisés notamment *in vivo*. De plus, le lien entre le processus d'EndoMT radio-induite et la sénescence reste à être déterminé ainsi que le rôle précis de chacun de ces deux mécanismes dans le contexte de l'irradiation. De par leur métabolisme actif et la sécrétion de facteurs solubles pro-inflammatoires et pro-fibrosants (SASP), l'accumulation de CS pourrait favoriser l'initiation du processus d'EndoMT, participant indirectement au développement de la fibrose digestive radio-induite. Par ailleurs, cette hypothèse est soutenue par plusieurs travaux qui ont montré que le SASP favorise l'expression de molécules d'adhésion VCAM-1 et ICAM-1, et la sécrétion d'IL-6 et d'IL-8 par les CE ([Gardner et al. 2015](#)), et est également associé au processus d'EMT *in vitro* ([Coppe et al. 2008](#)). Ces travaux démontrent donc qu'au-delà de leur influence directe via la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires dans le microenvironnement, les CS sont capables de modifier à distance le profil d'expression cytokinique des cellules avoisinantes (effet de proximité ou bystander), et de favoriser l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux. De plus, ces travaux ont également confirmé la présence de CS au sein de plaques athérosclérotiques chez l'homme, contexte pathologique qui a auparavant été associé avec le processus d'EndoMT radio-induit ([Kim et al. 2013](#)). Enfin, l'utilisation de souris déficientes pour PAI-1 dans l'endothélium (PAI-1 KO<sup>endo</sup>), facteur impliqué dans la sénescence cellulaire, fait par ailleurs l'objet d'un sujet de recherche au laboratoire et permettra d'améliorer les connaissances sur la sénescence radio-induite.

Au niveau moléculaire, il est admis que l'irradiation favorise la sénescence via l'activation du récepteur à l'IGF-1 (Insulin Growth Factor-1) ainsi que l'activation de la PI-3K. Néanmoins, la protéine **mTOR** (mammalian Target Of Rapamycin), est identifiée comme l'acteur moléculaire déterminant dans la régulation de ce phénomène ([Day et al. 2014](#)). L'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique de cette protéine, la rapamycine, a permis de montrer que la suppression de mTOR induit une réduction de la sénescence et favorise la survie cellulaire aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* ([Iglesias-Bartolome et al. 2012](#)). Concernant

l'EndoMT, plusieurs travaux s'accordent à démontrer l'effet bénéfique de l'inhibition de mTOR dans la réduction du processus d'EndoMT *in vitro* et *in vivo* (Zhang et al. 2013; Ranchoux et al. 2015). En effet, l'injection curative de rapamycine favorise la réduction de la fibrose pulmonaire dans un contexte d'hypertension pulmonaire chez la souris. Ces auteurs ont pu démontrer que cet effet passe par une réduction de l'EndoMT dans ce modèle confirmant la place centrale de mTOR à la fois dans l'EndoMT et la sénescence (Ranchoux et al. 2015). En ce sens, nous avons évalué l'effet de la rapamycine chez les HUVECs et notamment vis-à-vis de l'EndoMT radio-induite. Les premiers résultats obtenus n'ont cependant pas permis de déterminer un rôle bénéfique de la rapamycine dans la réduction des marqueurs de l'EndoMT chez les HUVECs après irradiation. De plus, nous avons constaté une certaine cytotoxicité de la rapamycine chez les cellules non-irradiées suggérant un problème de concentration de l'inhibiteur. Néanmoins cette voie moléculaire reste attrayante et d'autres mises au point s'avèrent nécessaires afin de déterminer la relation entre les processus de sénescence et d'EndoMT radio-induites.

Enfin, la protéine mTOR est également impliquée dans la régulation d'un autre mécanisme indispensable à l'homéostasie cellulaire, à savoir l'**autophagie**. Il s'agit d'un mécanisme de digestion cellulaire assurant le recyclage des organites et des macromolécules endommagés ou anciens, et permet la production simultanée d'énergie. Ce mécanisme est par ailleurs associé avec la sénescence (Young et al. 2010), et est impliqué dans une multitude de pathologies telles que les maladies neurodégénératives, les cancers ou encore les maladies cardiovasculaires et constitue donc une cible thérapeutique de choix. De façon intéressante, l'autophagie est aussi activée dans la réponse vasculaire aux rayonnements ionisants. Il a entre autres été montré que l'exposition d'HUVECs à une dose de 2 Gy induit une accumulation cytoplasmique de LC3A, LC3B et p62, protéines impliquées dans la formation de l'autophagosome (vésicules cytosolique), suggérant que l'irradiation bloque le flux autophagique (Kalamida et al. 2014). De manière intéressante, Singh *et al* ont pu relier la dysfonction du flux autophagique avec l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux, caractéristique de l'EndoMT. Parmi les mécanismes moléculaires mis en jeu, ces auteurs ont pu montrer que la perte de l'expression de la protéine ATG7 est un facteur prépondérant dans l'initiation de l'EndoMT (Singh et al. 2015). Dans ce contexte, l'étude du flux autophagique dans notre modèle d'EndoMT radio-induite semble être une voie d'étude prometteuse (**Figure**

37). La restauration de l'autophagie (via le SMER28 (Kalamida et al. 2014)), pourrait favoriser la réduction de l'expression des marqueurs mésenchymateux. L'ensemble de ces résultats confirment donc l'importance du processus d'EndoMT dans la réponse endothéliale aux rayonnements, et les efforts concernant sa caractérisation doivent se poursuivre dans ce sens afin de déterminer le rôle précis de mTOR/autophagie dans l'initiation de l'EndoMT radio-induite. Enfin, le flux autophagique semble être un mécanisme cellulaire essentiel au bon fonctionnement cellulaire, notamment dans le contexte de l'irradiation où l'exposition aux rayonnements induit d'importants dommages moléculaires au sein de la cellule. Ainsi, la mauvaise élimination ou un défaut de recyclage des organites endommagés pourrait accentuer la radiosensibilité cellulaire et entraîner l'activation de voies participant à l'initiation de l'EndoMT.



**Figure 37 :** Relation entre l'apoptose, la sénescence et l'autophagie dans l'initiation de l'EndoMT radio-induite. Inhibition de l'apoptose et de la sénescence en contexte physiologique associée à une bonne régulation du flux autophagique (flèches bleues). Activation des mécanismes de sénescence et d'apoptose associée avec une perturbation de l'autophagie après irradiation au profit de l'EndoMT (flèches rouges). Place centrale de mTOR dans la régulation de la sénescence et de l'autophagie et implication dans l'EndoMT radio-induite.



## Conclusion Générale

De façon générale, ce travail de thèse a permis d'apporter de nouvelles connaissances sur la réponse de l'endothélium vasculaire consécutive à une exposition aux rayonnements ionisants. Nous avons pu montrer au cours de cette étude que l'irradiation des cellules endothéliales microvasculaires et macrovasculaires favorise l'évolution du phénotype endothélial vers l'acquisition d'un phénotype mésenchymateux, caractérisant ainsi le processus d'EndoMT radio-induit. De plus, nos travaux ont pu révéler pour la première fois l'existence de ce phénomène au niveau rectal chez les patients traités par radiothérapie et dans un modèle préclinique de rectite radique chez la souris. Ces résultats soutiennent donc notre hypothèse quant à la participation de l'EndoMT dans le développement de la fibrose digestive radio-induite.

La caractérisation de l'EndoMT radio-induite *in vitro* nous a permis d'orienter nos recherches vers le rôle d'un facteur de transcription particulier, Hey2, connu pour être un des principaux effecteurs de la voie Notch. Les premiers résultats obtenus *in vitro* nous ont permis de confirmer une surexpression de ce facteur après irradiation. De plus, la génération d'un modèle de souris déficientes pour ce gène spécifiquement dans le compartiment endothélial a révélé une réduction des dommages muqueux après irradiation. Ces résultats sont encourageants et la création de ce modèle de souris Hey2 KO<sup>endo</sup> permettra également de préciser le rôle de Hey2 dans l'évolution de la pathologie fibrotique au long terme.

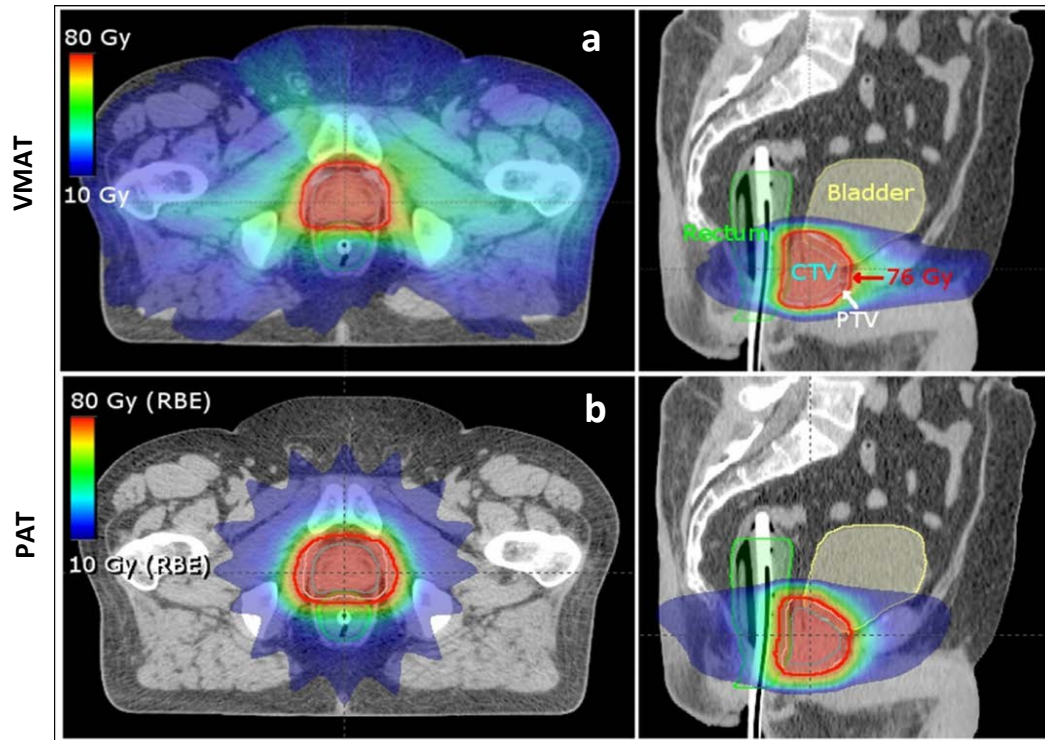
Enfin, ces travaux viennent confirmer l'implication de l'EndoMT dans un contexte pathologique, et plus précisément après irradiation, démontrant ainsi la place non négligeable de ce phénomène dans l'évolution de la pathogenèse fibrotique radio-induite. L'amélioration des connaissances et l'identification de cibles moléculaires impliquées dans l'initiation de l'EndoMT permettrait d'apporter de nouvelles possibilités thérapeutiques en clinique dans le futur.

## Annexes

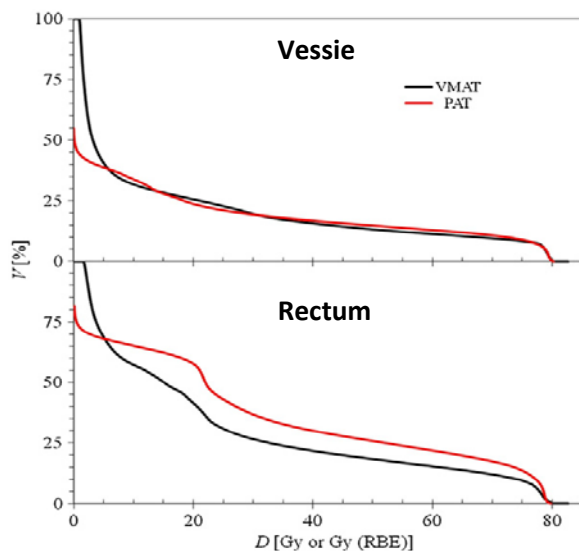
### Annexe 1 : Présentation des différents types de radiothérapies.

<b>Radiothérapie externe</b>	La plus utilisée. Utilisation d'accélérateurs linéaires d'électrons générant des faisceaux de rayons X ou faisceaux d'électrons de haute énergie.
<b>Curiethérapie/ brachythérapie</b>	Technique la plus ancienne où la source radioactive est placée pendant une durée limitée à l'intérieur du corps du patient. Cette technique permet de délivrer une forte dose au plus proche de la tumeur et préserve les tissus environnants. Utilisée pour les cancers gynécologiques (col de l'utérus, endomètre), cancer localisé de la prostate à risque faible ou intermédiaire.
<b>Radiothérapie métabolique ou vectorielle</b>	La source radioactive est dans ce cas-là injectée sous forme soluble (voie orale ou intraveineuse) pour se fixer sur les cellules cibles. Repose sur la capacité de certaines tumeurs à capter un élément circulant et permet l'irradiation de cellules tumorales disséminées. Importante toxicité des tissus sains qui vont métaboliser ce vecteur. Utilisée pour le cancer de la thyroïde.
<b>Radio-immunothérapie</b>	Source radioactive injectable (intraveineuse) contenant un rayonnement puissant (émission de particules $\alpha$ ). Anticorps monoclonal couplé à un isotope radioactif dirigé contre une structure spécifique située sur la cellule tumorale. Permet un traitement ciblé et préserve les tissus sains.

**Annexe 2 : Notion d'organe à risque en radiothérapie : cas du rectum dans le traitement du cancer de la prostate (Rechner et al. 2012).**



Exemple de distribution d'isodoses dans le cas d'un traitement du cancer de la prostate par radiothérapie. Plan de traitement par Irradiation avec Modulation d'intensité Volumétrique par ArcThérapie, VMAT (a), et par Proton Arc Thérapie, PAT (b). Coupes axiales (gauche) et sagittales (droite) au niveau de la région pelvienne. Gradient de distribution de dose : tumeur à traiter, dose maximale de 80 Gy (rouge), puis décroissance de la dose en fonction de la distance (bleu). CTV: Clinical Target Volume; PTV: Planning Target Volume; RBE: Relative Biological Effectiveness.



Histogramme dose-volume représentant le volume (en %) des organes à risque, ici la vessie et le rectum, en fonction de la dose reçue (en Gray) dans le cas du traitement du cancer de la prostate par VMAT et PAT.

**Annexe 3 : Score des complications chroniques digestives (intestin grêle et côlon) défini par le RTOG/EORTC.**

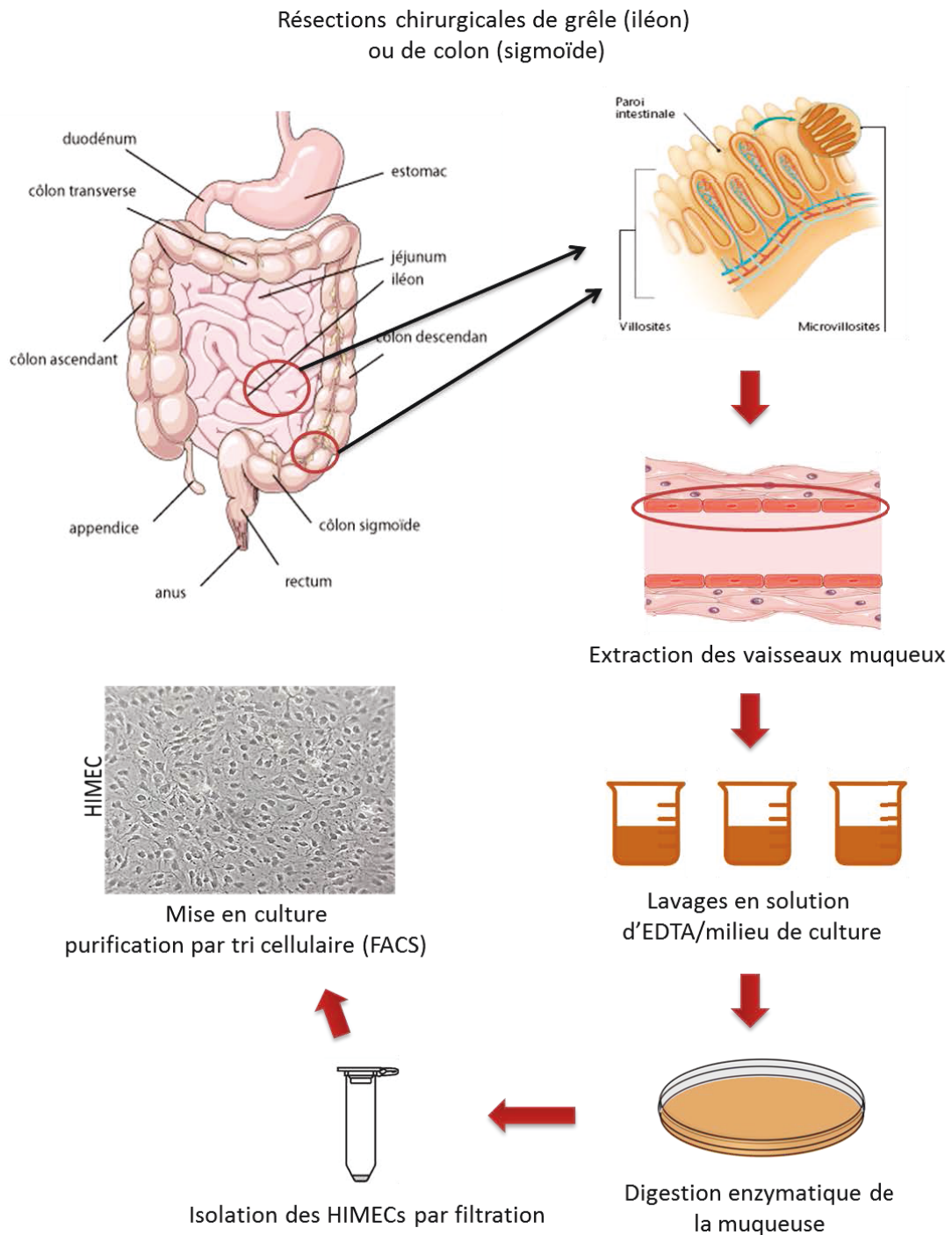
Grades	Type de complications intestinales observées RTOG/EORTC (élément du LENT/SOMA en italique)
0	Pas d'effets secondaires notables.
1	Diarrhée légère, légères crampes abdominales, augmentation de la fréquence des selles jusqu'à 5 fois par jour, présence de mucus et de légers saignements rectaux. <i>Ulcération superficielle (<math>\leq 1\text{cm}^2</math>).</i>
2	Diarrhée modérée et les coliques sont supérieurs à 5 fois/ jour, mucus rectal excessif et des saignements intermittents. <i>Ulcération superficielle (<math>&gt; 1\text{cm}^2</math>); stricture (1/3-2/3 diamètre normal).</i>
3	Obstruction ou saignements nécessitant une intervention chirurgicale. <i>Stricture (<math>&lt;1/3</math> diamètre normal) ; incontinences persistantes.</i>
4	Tissu nécrosé, présence de perforations ou de fistules, engagement du pronostic vital du patient. <i>Incontinences réfractaires nécessitant une chirurgie.</i>
5	Décès du patient.

RTOG: Radiation Therapy Oncology Group; EORTC: European Organization for Research and Treatment of Cancer; lent/soma/ Late effects of normal tissue, subjective, objective, management, analytic.

**Annexe 4 : Comparaison de l'EndoMT et de l'EMT : physiologie, physiopathologie et mécanismes (adapté à partir Arciniegas *et al.* 2007).**

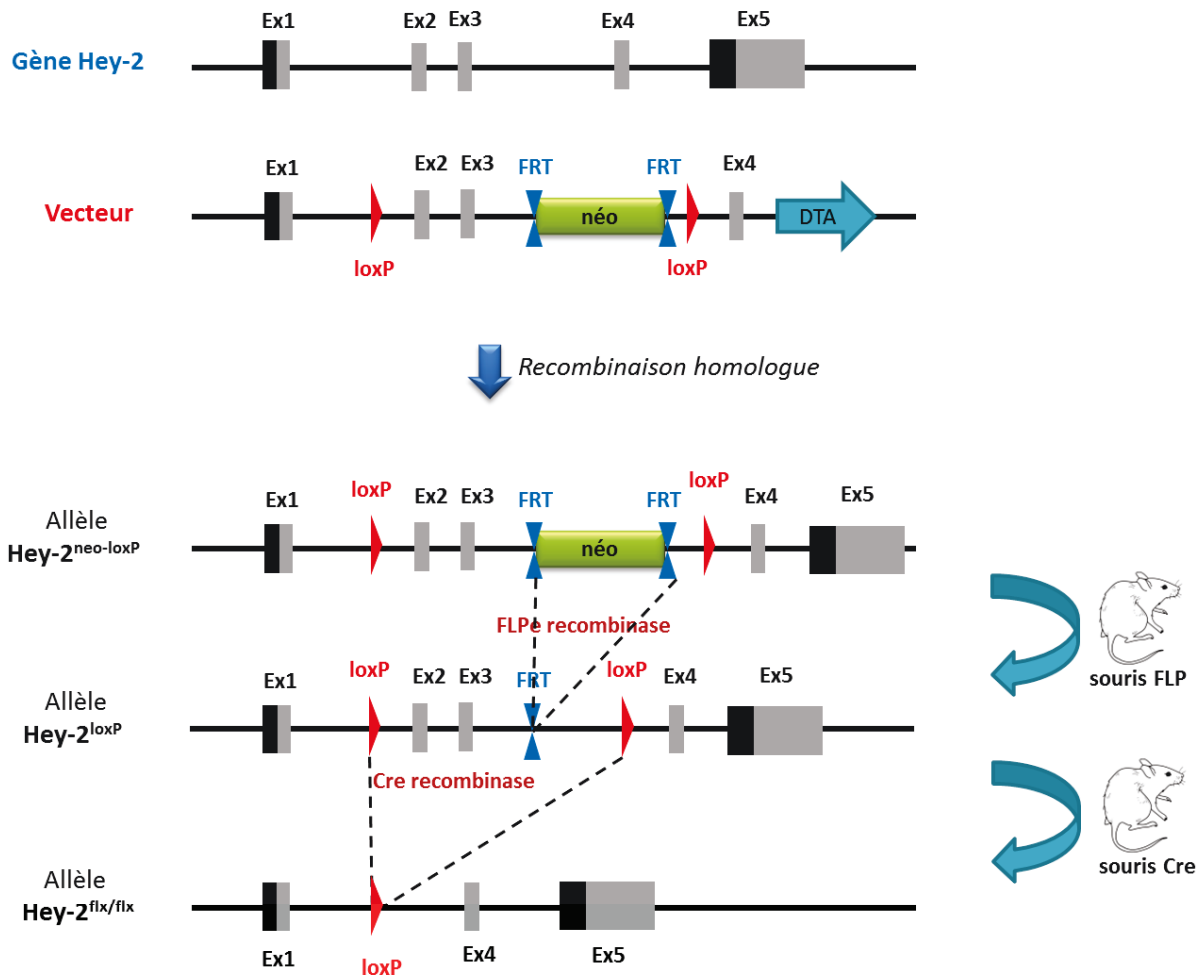
Contexte tissulaire	EndoMT	EMT
<b>Développement</b>	Valvulogenèse, formation du septum, artères pulmonaires, aorte	Gastrulation, crêtes neurales, cœur, système musculo-squelettique, système nerveux périphérique
<b>Réparation tissulaire</b>	Granulation dermique post-lésionnelle, athérosclérose cardiaque et rénale après transplantation, sténose	Fibroses rénale et pulmonaire, remodelage des voies aériennes (asthme), fibrose oculaire (cristallin)
<b>Tumorigenèse</b>	Fibroblastes associés au carcinome (CAF), dissémination métastatique	Dissémination métastatique (carcinome/sarcome)
<b>Acteurs potentiels de la transition</b>	Wnt, TGF- $\beta$ , Jagged/Notch, PAR-1, FGF-2, HGF, intégrines, MMPs	Wnt, TGF- $\beta$ , Jagged/Notch, PAR-1, EGF, IGF-II, FGF-2, HGF, intégrines, MMPs
<b>Marqueurs phénotypiques Perte au cours de la transition</b>	VE-cadhérine, Tie1/2, VEGFR-1/2, PECAM-1/CD31, vWF	E-cadhérine, $\alpha$ et $\gamma$ caténines, desmoplakine, zona occludens-1, cytokératine-18
<b>Marqueurs phénotypiques Gain au cours de la transition</b>	$\alpha$ -SMA, collagènes I et III, vimentine, calponine, N-cadhérine, FSP-1, SM22 $\alpha$	$\alpha$ -SMA, fibronectine, collagènes I et III, vimentine, calponine, N-cadhérine, FSP-1, SM22 $\alpha$
<b>Réversibilité biologique</b>	Connaissances limitées	Transition mésenchyme-épithéliale (MET)

**Annexe 5 : Principales étapes nécessaires à l'extraction des HIMECs. Collaboration avec le Dr C. Fiocchi, Cleveland Clinic, Ohio USA.**





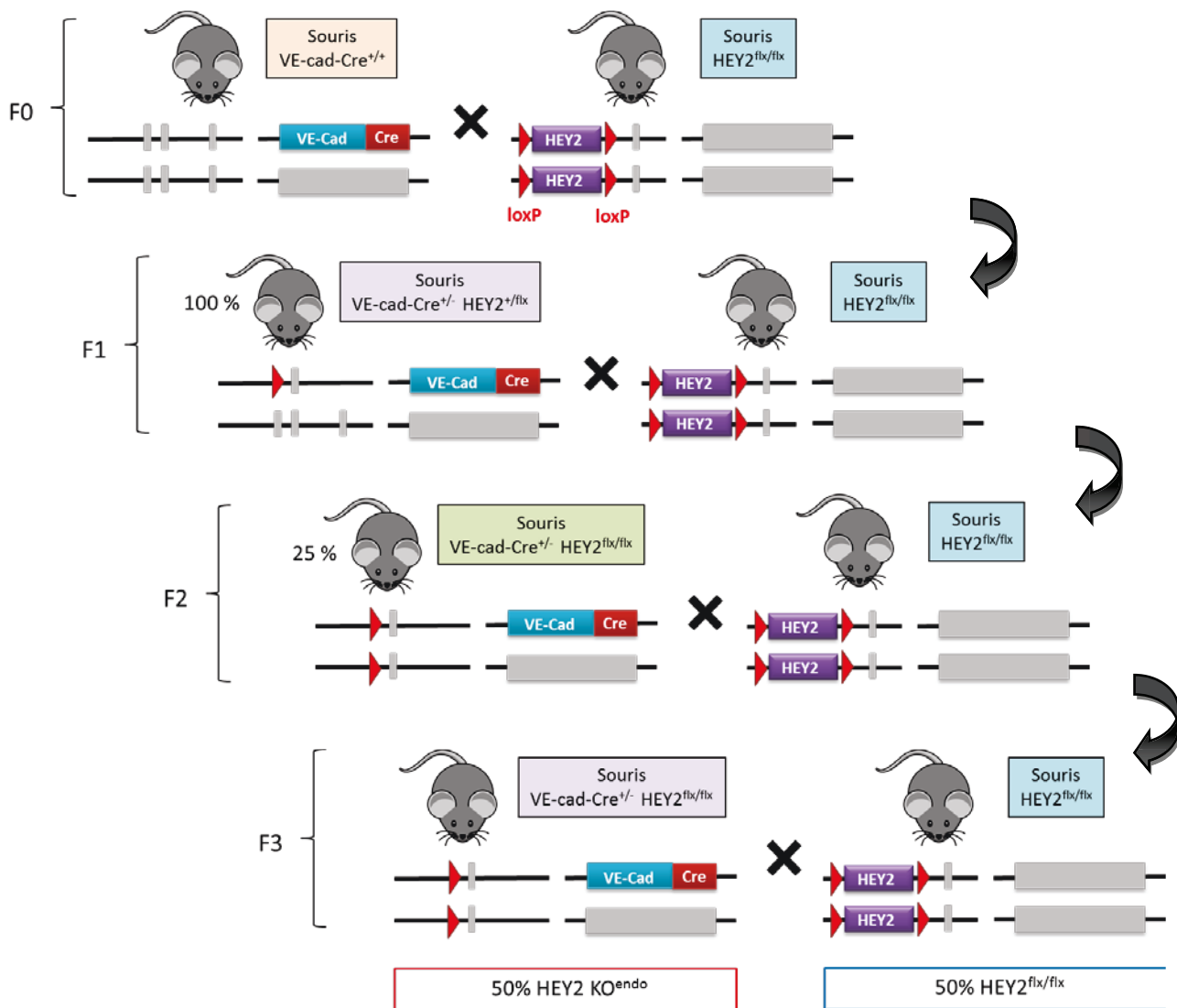
**Annexe 6 : Caractéristiques génétiques de la souche de souris Hey2<sup>flx/flx</sup> (Xin et al. 2007).**



Un vecteur plasmidique contenant une version modifiée du gène *Hey2* (vecteur) a été inséré dans des cellules souches embryonnaires (ES). Cette séquence modifiée comprend : (i) deux sites loxP encadrant les exons 2 et 3 ; (ii) une cassette de résistance à la néomycine (néo), située entre le premier site loxP et l'exon 4 qui permettra la sélection positive des cellules ES qui auront intégré le transgène par recombinaison homologue ; (iii) deux séquences FRT (Flippase Recognition Target), flanquées de part et d'autres de la cassette néo, qui permettront l'élimination de la cassette par croisement avec une souche de souris exprimant l'enzyme Flp ; (iv) une cassette de sensibilité à la toxine diphtérique (DTA), située en 5' de l'exon 4 qui permettra une sélection négative des cellules ES qui auront intégré le transgène par insertion aléatoire.

L'excision de la région située entre les sites loxP élimine les acides aminés 29 à 82 incluant une majeure partie de la région bHLH. L'épissage de l'exon 1 à 4 entraîne un décalage du cadre de lecture et engendre la formation d'une protéine *Hey2* tronquée non fonctionnelle.

**Annexe 7 : Stratégie de croisement permettant l'obtention des souris HEY2 KO<sup>endo</sup>. (F représente la génération des animaux).**



## Références Bibliographiques

- Abderrahmani, R., A. Francois, V. Buard, M. Benderitter, J. C. Sabourin, D. L. Crandall and F. Milliat (2009). "Effects of pharmacological inhibition and genetic deficiency of plasminogen activator inhibitor-1 in radiation-induced intestinal injury." Int J Radiat Oncol Biol Phys **74**(3): 942-948.
- Abderrahmani, R., A. Francois, V. Buard, G. Tarlet, K. Blirando, M. Hneino, A. Vaurijoux, M. Benderitter, J. C. Sabourin and F. Milliat (2012). "PAI-1-dependent endothelial cell death determines severity of radiation-induced intestinal injury." PLoS One **7**(4): e35740.
- Abu El-Asrar, A. M., G. De Hertogh, K. van den Eynde, K. Alam, K. Van Raemdonck, G. Opdenakker, J. Van Damme, K. Geboes and S. Struyf (2015). "Myofibroblasts in proliferative diabetic retinopathy can originate from infiltrating fibrocytes and through endothelial-to-mesenchymal transition (EndoMT)." Exp Eye Res **132**: 179-189.
- Aird, W. C. (2003). "Endothelial cell heterogeneity." Crit Care Med **31**(4 Suppl): S221-230.
- Akhurst, R. J. and A. Hata (2012). "Targeting the TGFbeta signalling pathway in disease." Nat Rev Drug Discov **11**(10): 790-811.
- Albeiroti, S. S., A and C. De la Motte (2015). "Hyaluronan's Role in Fibrosis: A Pathogenic Factor or a Passive Player?" BioMed Research International.
- Alva, J. A., A. C. Zovein, A. Monvoisin, T. Murphy, A. Salazar, N. L. Harvey, P. Carmeliet and M. L. Iruela-Arispe (2006). "VE-Cadherin-Cre-recombinase transgenic mouse: a tool for lineage analysis and gene deletion in endothelial cells." Dev Dyn **235**(3): 759-767.
- Andreyev, H. J., A. Wotherspoon, J. W. Denham and M. Hauer-Jensen (2010). "Defining pelvic-radiation disease for the survivorship era." Lancet Oncol **11**(4): 310-312.
- Andreyev, H. J., A. Wotherspoon, J. W. Denham and M. Hauer-Jensen (2011). "Pelvic radiation disease": new understanding and new solutions for a new disease in the era of cancer survivorship." Scand J Gastroenterol **46**(4): 389-397.
- Anghelina, M., L. Moldovan and N. I. Moldovan (2005). "Preferential activity of Tie2 promoter in arteriolar endothelium." J Cell Mol Med **9**(1): 113-121.
- Arciniegas, E., M. G. Frid, I. S. Douglas and K. R. Stenmark (2007). "Perspectives on endothelial-to-mesenchymal transition: potential contribution to vascular remodeling in chronic pulmonary hypertension." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **293**(1): L1-8.
- Arciniegas, E., A. B. Sutton, T. D. Allen and A. M. Schor (1992). "Transforming growth factor beta 1 promotes the differentiation of endothelial cells into smooth muscle-like cells in vitro." J Cell Sci **103** ( Pt 2): 521-529.
- Baluna, R. G., T. Y. Eng and C. R. Thomas (2006). "Adhesion molecules in radiotherapy." Radiat Res **166**(6): 819-831.
- Barker, N. (2014). "Adult intestinal stem cells: critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration." Nat Rev Mol Cell Biol **15**(1): 19-33.
- Barker, N., J. H. van Es, J. Kuipers, P. Kujala, M. van den Born, M. Cozijnsen, A. Haegebarth, J. Korving, H. Begthel, P. J. Peters and H. Clevers (2007). "Identification of stem cells in small intestine and colon by marker gene Lgr5." Nature **449**(7165): 1003-1007.

- Bentzen, S. M. (2006). "Preventing or reducing late side effects of radiation therapy: radiobiology meets molecular pathology." Nat Rev Cancer **6**(9): 702-713.
- Bentzen, S. M. and J. Overgaard (1994). "Patient-to-Patient Variability in the Expression of Radiation-Induced Normal Tissue Injury." Semin Radiat Oncol **4**(2): 68-80.
- Beranek, J. T. (1989). "Ingrowth of hyperplastic capillary sprouts into fibrin clots: further evidence in favor of the angiogenic hypothesis of repair and fibrosis." Med Hypotheses **28**(4): 271-273.
- Bhanja, P., S. Saha, R. Kabarriti, L. Liu, N. Roy-Chowdhury, J. Roy-Chowdhury, R. S. Sellers, A. A. Alfieri and C. Guha (2009). "Protective role of R-spondin1, an intestinal stem cell growth factor, against radiation-induced gastrointestinal syndrome in mice." PLoS One **4**(11): e8014.
- Binion, D. G., G. A. West, K. Ina, N. P. Ziats, S. N. Emancipator and C. Fiocchi (1997). "Enhanced leukocyte binding by intestinal microvascular endothelial cells in inflammatory bowel disease." Gastroenterology **112**(6): 1895-1907.
- Bismar, M. M. and F. A. Sinicrope (2002). "Radiation enteritis." Curr Gastroenterol Rep **4**(5): 361-365.
- Blirando, K., F. Milliat, I. Martelly, J. C. Sabourin, M. Benderitter and A. Francois (2011). "Mast cells are an essential component of human radiation proctitis and contribute to experimental colorectal damage in mice." Am J Pathol **178**(2): 640-651.
- Booth, C. and C. S. Potten (2000). "Gut instincts: thoughts on intestinal epithelial stem cells." J Clin Invest **105**(11): 1493-1499.
- Bourgier, C., V. Haydont, F. Milliat, A. Francois, V. Holler, P. Lasser, J. Bourhis, D. Mathe and M. C. Vozenin-Brotans (2005). "Inhibition of Rho kinase modulates radiation induced fibrogenic phenotype in intestinal smooth muscle cells through alteration of the cytoskeleton and connective tissue growth factor expression." Gut **54**(3): 336-343.
- Bray, S. J. (2006). "Notch signalling: a simple pathway becomes complex." Nat Rev Mol Cell Biol **7**(9): 678-689.
- Burdelya, L. G., V. I. Krivokrysenko, T. C. Tallant, E. Strom, A. S. Gleiberman, D. Gupta, O. V. Kurnasov, F. L. Fort, A. L. Osterman, J. A. Didonato, E. Feinstein and A. V. Gudkov (2008). "An agonist of toll-like receptor 5 has radioprotective activity in mouse and primate models." Science **320**(5873): 226-230.
- Burton, D. G. and V. Krizhanovsky (2014). "Physiological and pathological consequences of cellular senescence." Cell Mol Life Sci **71**(22): 4373-4386.
- Cetin, E., A. S. Ozturk, H. Orhun and S. Ulger (2014). "Role of triamcinolone in radiation enteritis management." World J Gastroenterol **20**(15): 4341-4344.
- Ch'ang, H. J., J. G. Maj, F. Paris, H. R. Xing, J. Zhang, J. P. Truman, C. Cardon-Cardo, A. Haimovitz-Friedman, R. Kolesnick and Z. Fuks (2005). "ATM regulates target switching to escalating doses of radiation in the intestines." Nat Med **11**(5): 484-490.
- Chang, P. Y., Y. Q. Qu, J. Wang and L. H. Dong (2015). "The potential of mesenchymal stem cells in the management of radiation enteropathy." Cell Death Dis **6**: e1840.
- Chaudhuri, V., L. Zhou and M. Karasek (2007). "Inflammatory cytokines induce the transformation of human dermal microvascular endothelial cells into myofibroblasts: a potential role in skin fibrogenesis." J Cutan Pathol **34**(2): 146-153.
- Chen, P. Y., L. Qin, C. Barnes, K. Charisse, T. Yi, X. Zhang, R. Ali, P. P. Medina, J. Yu, F. J. Slack, D. G. Anderson, V. Kotlianski, F. Wang, G. Tellides and M. Simons (2012). "FGF

- regulates TGF-beta signaling and endothelial-to-mesenchymal transition via control of let-7 miRNA expression." *Cell Rep* **2**(6): 1684-1696.
- Chi, J. T., H. Y. Chang, G. Haraldsen, F. L. Jahnsen, O. G. Troyanskaya, D. S. Chang, Z. Wang, S. G. Rockson, M. van de Rijn, D. Botstein and P. O. Brown (2003). "Endothelial cell diversity revealed by global expression profiling." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(19): 10623-10628.
- Chin, M. T., K. Maemura, S. Fukumoto, M. K. Jain, M. D. Layne, M. Watanabe, C. M. Hsieh and M. E. Lee (2000). "Cardiovascular basic helix loop helix factor 1, a novel transcriptional repressor expressed preferentially in the developing and adult cardiovascular system." *J Biol Chem* **275**(9): 6381-6387.
- Cho, C. H., R. A. Kammerer, H. J. Lee, K. Yasunaga, K. T. Kim, H. H. Choi, W. Kim, S. H. Kim, S. K. Park, G. M. Lee and G. Y. Koh (2004). "Designed angiopoietin-1 variant, COMP-Ang1, protects against radiation-induced endothelial cell apoptosis." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(15): 5553-5558.
- Choi, S. H., Z. Y. Hong, J. K. Nam, H. J. Lee, J. Jang, R. J. Yoo, Y. J. Lee, C. Y. Lee, K. H. Kim, S. Park, Y. H. Ji, Y. S. Lee and J. Cho (2015). "A Hypoxia-Induced Vascular Endothelial-to-Mesenchymal Transition in Development of Radiation-Induced Pulmonary Fibrosis." *Clin Cancer Res*.
- Clements, M. E., C. J. Chaber, S. R. Ledbetter and A. Zuk (2013). "Increased cellular senescence and vascular rarefaction exacerbate the progression of kidney fibrosis in aged mice following transient ischemic injury." *PLoS One* **8**(8): e70464.
- Coll-Bonfill, N., M. M. Musri, V. Ivo, J. A. Barbera and O. Tura-Ceide (2015). "Transdifferentiation of endothelial cells to smooth muscle cells play an important role in vascular remodelling." *Am J Stem Cells* **4**(1): 13-21.
- Cooley, B. C., J. Nevado, J. Mellad, D. Yang, C. St Hilaire, A. Negro, F. Fang, G. Chen, H. San, A. D. Walts, R. L. Schwartzbeck, B. Taylor, J. D. Lanzer, A. Wragg, A. Elagha, L. E. Beltran, C. Berry, R. Feil, R. Virmani, E. Ladich, J. C. Kovacic and M. Boehm (2014). "TGF-beta signaling mediates endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT) during vein graft remodeling." *Sci Transl Med* **6**(227): 227ra234.
- Coppe, J. P., C. K. Patil, F. Rodier, Y. Sun, D. P. Munoz, J. Goldstein, P. S. Nelson, P. Y. Desprez and J. Campisi (2008). "Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor." *PLoS Biol* **6**(12): 2853-2868.
- Corre, I., M. Guillonnet and F. Paris (2013). "Membrane signaling induced by high doses of ionizing radiation in the endothelial compartment. Relevance in radiation toxicity." *Int J Mol Sci* **14**(11): 22678-22696.
- Cortez, M. A., D. Valdecanas, X. Zhang, Y. Zhan, V. Bhardwaj, G. A. Calin, R. Komaki, D. K. Giri, C. C. Quini, T. Wolfe, H. J. Peltier, A. G. Bader, J. V. Heymach, R. E. Meyn and J. W. Welsh (2014). "Therapeutic delivery of miR-200c enhances radiosensitivity in lung cancer." *Mol Ther* **22**(8): 1494-1503.
- Crosby, C. V., P. A. Fleming, W. S. Argraves, M. Corada, L. Zanetta, E. Dejana and C. J. Drake (2005). "VE-cadherin is not required for the formation of nascent blood vessels but acts to prevent their disassembly." *Blood* **105**(7): 2771-2776.
- Cui, W., J. Ma, Y. Wang and S. Biswal (2011). "Plasma miRNA as biomarkers for assessment of total-body radiation exposure dosimetry." *PLoS One* **6**(8): e22988.

- D'Alessio, S., C. Tacconi, C. Fiocchi and S. Danese (2013). "Advances in therapeutic interventions targeting the vascular and lymphatic endothelium in inflammatory bowel disease." Curr Opin Gastroenterol **29**(6): 608-613.
- Day, R. M., A. L. Snow and R. A. Panganiban (2014). "Radiation-induced accelerated senescence: a fate worse than death?" Cell Cycle **13**(13): 2011-2012.
- De Palma, M., M. A. Venneri, R. Galli, L. Sergi Sergi, L. S. Politi, M. Sampaolesi and L. Naldini (2005). "Tie2 identifies a hematopoietic lineage of proangiogenic monocytes required for tumor vessel formation and a mesenchymal population of pericyte progenitors." Cancer Cell **8**(3): 211-226.
- De Palma, M., M. A. Venneri, C. Roca and L. Naldini (2003). "Targeting exogenous genes to tumor angiogenesis by transplantation of genetically modified hematopoietic stem cells." Nat Med **9**(6): 789-795.
- Delanian, S., F. Baillet, J. Huart, J. L. Lefaix, C. Maulard and M. Housset (1994). "Successful treatment of radiation-induced fibrosis using liposomal Cu/Zn superoxide dismutase: clinical trial." Radiother Oncol **32**(1): 12-20.
- Delanian, S., M. Martin, A. Bravard, C. Luccioni and J. L. Lefaix (2001). "Cu/Zn superoxide dismutase modulates phenotypic changes in cultured fibroblasts from human skin with chronic radiotherapy damage." Radiother Oncol **58**(3): 325-331.
- Delanian, S., R. Porcher, S. Balla-Mekias and J. L. Lefaix (2003). "Randomized, placebo-controlled trial of combined pentoxifylline and tocopherol for regression of superficial radiation-induced fibrosis." J Clin Oncol **21**(13): 2545-2550.
- Denham, J. W. and M. Hauer-Jensen (2002). "The radiotherapeutic injury--a complex 'wound'." Radiother Oncol **63**(2): 129-145.
- Denham, J. W., M. Hauer-Jensen and L. J. Peters (2001). "Is it time for a new formalism to categorize normal tissue radiation injury?" Int J Radiat Oncol Biol Phys **50**(5): 1105-1106.
- di Mola, F. F., H. Friess, A. Scheuren, P. Di Sebastiano, H. Graber, B. Egger, A. Zimmermann, M. Korc and M. W. Buchler (1999). "Transforming growth factor-beta and their signaling receptors are coexpressed in Crohn's disease." Ann Surg **229**(1): 67-75.
- Ding, N. H., J. J. Li and L. Q. Sun (2013). "Molecular mechanisms and treatment of radiation-induced lung fibrosis." Curr Drug Targets **14**(11): 1347-1356.
- Dorr, W. and J. H. Hendry (2001). "Consequential late effects in normal tissues." Radiother Oncol **61**(3): 223-231.
- Egorova, A. D., P. P. Khedoe, M. J. Goumans, B. K. Yoder, S. M. Nauli, P. ten Dijke, R. E. Poelmann and B. P. Hierck (2011). "Lack of primary cilia primes shear-induced endothelial-to-mesenchymal transition." Circ Res **108**(9): 1093-1101.
- Epperly, M. W., C. A. Sikora, S. J. DeFilippi, J. A. Gretton, Q. Zhan, D. W. Kufe and J. S. Greenberger (2002). "Manganese superoxide dismutase (SOD2) inhibits radiation-induced apoptosis by stabilization of the mitochondrial membrane." Radiat Res **157**(5): 568-577.
- Fajardo, L. F. (2005). "The pathology of ionizing radiation as defined by morphologic patterns." Acta Oncol **44**(1): 13-22.
- Fischer, A. and M. Gessler (2003). "Hey genes in cardiovascular development." Trends Cardiovasc Med **13**(6): 221-226.
- Fischer, A., B. Klamt, N. Schumacher, C. Glaeser, I. Hansmann, H. Fenge and M. Gessler (2004a). "Phenotypic variability in Hey2 -/- mice and absence of HEY2 mutations in



- patients with congenital heart defects or Alagille syndrome." Mamm Genome **15**(9): 711-716.
- Fischer, A., N. Schumacher, M. Maier, M. Sendtner and M. Gessler (2004b). "The Notch target genes Hey1 and Hey2 are required for embryonic vascular development." Genes Dev **18**(8): 901-911.
- Flanders, K. C., B. M. Ho, P. R. Arany, C. Stuelten, M. Mamura, M. O. Paterniti, A. Sowers, J. B. Mitchell and A. B. Roberts (2008). "Absence of Smad3 induces neutrophil migration after cutaneous irradiation: possible contribution to subsequent radioprotection." Am J Pathol **173**(1): 68-76.
- Flanders, K. C., C. D. Sullivan, M. Fujii, A. Sowers, M. A. Anzano, A. Arabshahi, C. Major, C. Deng, A. Russo, J. B. Mitchell and A. B. Roberts (2002). "Mice lacking Smad3 are protected against cutaneous injury induced by ionizing radiation." Am J Pathol **160**(3): 1057-1068.
- Fleenor, B. S., K. D. Marshall, C. Rippe and D. R. Seals (2012). "Replicative aging induces endothelial to mesenchymal transition in human aortic endothelial cells: potential role of inflammation." J Vasc Res **49**(1): 59-64.
- Flier, S. N., H. Tanjore, E. G. Kokkotou, H. Sugimoto, M. Zeisberg and R. Kalluri (2010). "Identification of epithelial to mesenchymal transition as a novel source of fibroblasts in intestinal fibrosis." J Biol Chem **285**(26): 20202-20212.
- Followill, D. S., D. Kester and E. L. Travis (1993). "Histological changes in mouse colon after single- and split-dose irradiation." Radiat Res **136**(2): 280-288.
- Followill, D. S. and E. L. Travis (1995). "Differential expression of collagen types I and III in consequential and primary fibrosis in irradiated mouse colon." Radiat Res **144**(3): 318-328.
- Francois, A., F. Milliat, O. Guipaud and M. Benderitter (2013). "Inflammation and immunity in radiation damage to the gut mucosa." Biomed Res Int **2013**: 123241.
- Francois, A., F. Milliat, N. Jullien, K. Blirando, R. Abderrahmani and M. Benderitter (2009). "[Radiotherapy: what therapeutic orientations against the digestive aftereffects?]." Med Sci (Paris) **25**(3): 267-272.
- Frid, M. G., V. A. Kale and K. R. Stenmark (2002). "Mature vascular endothelium can give rise to smooth muscle cells via endothelial-mesenchymal transdifferentiation: in vitro analysis." Circ Res **90**(11): 1189-1196.
- Fu, Y., A. Chang, L. Chang, K. Niessen, S. Eapen, A. Setiadi and A. Karsan (2009). "Differential regulation of transforming growth factor beta signaling pathways by Notch in human endothelial cells." J Biol Chem **284**(29): 19452-19462.
- Fu, Y., A. C. Chang, M. Fournier, L. Chang, K. Niessen and A. Karsan (2011). "RUNX3 maintains the mesenchymal phenotype after termination of the Notch signal." J Biol Chem **286**(13): 11803-11813.
- Fuccio, L., L. Frazzoni and A. Guido (2015). "Prevention of pelvic radiation disease." World J Gastrointest Pharmacol Ther **6**(1): 1-9.
- Fuccio, L., A. Guido and H. J. Andreyev (2012). "Management of intestinal complications in patients with pelvic radiation disease." Clin Gastroenterol Hepatol **10**(12): 1326-1334 e1324.
- Fukasawa, H., T. Yamamoto, A. Togawa, N. Ohashi, Y. Fujigaki, T. Oda, C. Uchida, K. Kitagawa, T. Hattori, S. Suzuki, M. Kitagawa and A. Hishida (2004). "Down-regulation of Smad7

- expression by ubiquitin-dependent degradation contributes to renal fibrosis in obstructive nephropathy in mice." *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(23): 8687-8692.
- Fuks, Z., R. S. Persaud, A. Alfieri, M. McLoughlin, D. Ehleiter, J. L. Schwartz, A. P. Seddon, C. Cordon-Cardo and A. Haimovitz-Friedman (1994). "Basic fibroblast growth factor protects endothelial cells against radiation-induced programmed cell death in vitro and in vivo." *Cancer Res* **54**(10): 2582-2590.
- Garcia-Barros, M., F. Paris, C. Cordon-Cardo, D. Lyden, S. Rafii, A. Haimovitz-Friedman, Z. Fuks and R. Kolesnick (2003). "Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis." *Science* **300**(5622): 1155-1159.
- Garcia, J., M. J. Sandi, P. Cordelier, B. Binetruy, J. Pouyssegur, J. L. Iovanna and R. Tournaire (2012). "Tie1 deficiency induces endothelial-mesenchymal transition." *EMBO Rep* **13**(5): 431-439.
- Gardner, S. E., M. Humphry, M. R. Bennett and M. C. Clarke (2015). "Senescent Vascular Smooth Muscle Cells Drive Inflammation Through an Interleukin-1alpha-Dependent Senescence-Associated Secretory Phenotype." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **35**(9): 1963-1974.
- Garside, V. C., A. C. Chang, A. Karsan and P. A. Hoodless (2013). "Co-ordinating Notch, BMP, and TGF-beta signaling during heart valve development." *Cell Mol Life Sci* **70**(16): 2899-2917.
- Gasperini, P., G. Espigol-Frigole, P. J. McCormick, O. Salvucci, D. Maric, T. S. Uldrick, M. N. Polizzotto, R. Yarchoan and G. Tosato (2012). "Kaposi sarcoma herpesvirus promotes endothelial-to-mesenchymal transition through Notch-dependent signaling." *Cancer Res* **72**(5): 1157-1169.
- Gaugler, M. H., C. Squiban, A. van der Meeren, J. M. Bertho, M. Vandamme and M. A. Mouthon (1997). "Late and persistent up-regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression by ionizing radiation in human endothelial cells in vitro." *Int J Radiat Biol* **72**(2): 201-209.
- Gaugler, M. H., V. Vereycken-Holler, C. Squiban and J. Aigueperse (2004). "PECAM-1 (CD31) is required for interactions of platelets with endothelial cells after irradiation." *J Thromb Haemost* **2**(11): 2020-2026.
- Gerbe, F., C. Legraverend and P. Jay (2012). "The intestinal epithelium tuft cells: specification and function." *Cell Mol Life Sci* **69**(17): 2907-2917.
- Ghosh, A. K., V. Nagpal, J. W. Covington, M. A. Michaels and D. E. Vaughan (2012). "Molecular basis of cardiac endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT): differential expression of microRNAs during EndMT." *Cell Signal* **24**(5): 1031-1036.
- Good, R. B., A. J. Gilbane, S. L. Trinder, C. P. Denton, G. Coghlan, D. J. Abraham and A. M. Holmes (2015). "Endothelial to Mesenchymal Transition Contributes to Endothelial Dysfunction in Pulmonary Arterial Hypertension." *Am J Pathol* **185**(7): 1850-1858.
- Goumans, M. J., A. J. van Zonneveld and P. ten Dijke (2008). "Transforming growth factor beta-induced endothelial-to-mesenchymal transition: a switch to cardiac fibrosis?" *Trends Cardiovasc Med* **18**(8): 293-298.
- Gremy, O., M. Benderitter and C. Linard (2006). "Caffeic acid phenethyl ester modifies the Th1/Th2 balance in ileal mucosa after gamma-irradiation in the rat by modulating the cytokine pattern." *World J Gastroenterol* **12**(31): 4996-5004.

- Gremy, O., M. Benderitter and C. Linard (2008). "Acute and persisting Th2-like immune response after fractionated colorectal gamma-irradiation." World J Gastroenterol **14**(46): 7075-7085.
- Gu, Q., D. Wang, X. Wang, R. Peng, J. Liu, H. Deng, Z. Wang and T. Jiang (2004). "Basic fibroblast growth factor inhibits radiation-induced apoptosis of HUVECs. II. The RAS/MAPK pathway and phosphorylation of BAD at serine 112." Radiat Res **161**(6): 703-711.
- Gudkov, A. V. and A. Gleiberman (2008). "In regard to Schuller et Al. (Int J Radiat Oncol Biol Phys 2007;68:205-210)." Int J Radiat Oncol Biol Phys **70**(3): 800-801; author reply 802-803.
- Gulbins, E. and R. Kolesnick (2003). "Raft ceramide in molecular medicine." Oncogene **22**(45): 7070-7077.
- Haimovitz-Friedman, A., N. Balaban, M. McLoughlin, D. Ehleiter, J. Michaeli, I. Vlodavsky and Z. Fuks (1994a). "Protein kinase C mediates basic fibroblast growth factor protection of endothelial cells against radiation-induced apoptosis." Cancer Res **54**(10): 2591-2597.
- Haimovitz-Friedman, A., C. C. Kan, D. Ehleiter, R. S. Persaud, M. McLoughlin, Z. Fuks and R. N. Kolesnick (1994b). "Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis." J Exp Med **180**(2): 525-535.
- Haimovitz-Friedman, A., I. Vlodavsky, A. Chaudhuri, L. Witte and Z. Fuks (1991). "Autocrine effects of fibroblast growth factor in repair of radiation damage in endothelial cells." Cancer Res **51**(10): 2552-2558.
- Hall, S. M., A. A. Hislop and S. G. Haworth (2002). "Origin, differentiation, and maturation of human pulmonary veins." Am J Respir Cell Mol Biol **26**(3): 333-340.
- Hallahan, D. E., L. Geng and Y. Shyr (2002). "Effects of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) null mutation on radiation-induced pulmonary fibrosis and respiratory insufficiency in mice." J Natl Cancer Inst **94**(10): 733-741.
- Hamama, S., S. Delanian, V. Monceau and M. C. Vozenin (2012). "Therapeutic management of intestinal fibrosis induced by radiation therapy: from molecular profiling to new intervention strategies et vice et versa." Fibrogenesis Tissue Repair **5**(Suppl 1): S13.
- Hamama, S., M. Z. Noman, P. Gervaz, S. Delanian and M. C. Vozenin (2014). "MiR-210: A potential therapeutic target against radiation-induced enteropathy." Radiother Oncol **111**(2): 219-221.
- Hashimoto, N., S. H. Phan, K. Imaizumi, M. Matsuo, H. Nakashima, T. Kawabe, K. Shimokata and Y. Hasegawa (2010). "Endothelial-mesenchymal transition in bleomycin-induced pulmonary fibrosis." Am J Respir Cell Mol Biol **43**(2): 161-172.
- Hatoum, O. A., M. F. Otterson, D. Kopelman, H. Miura, I. Sukhotnik, B. T. Larsen, R. M. Selle, J. E. Moulder and D. D. Gutterman (2006). "Radiation induces endothelial dysfunction in murine intestinal arterioles via enhanced production of reactive oxygen species." Arterioscler Thromb Vasc Biol **26**(2): 287-294.
- Hauer-Jensen, M., J. W. Denham and H. J. Andreyev (2014). "Radiation enteropathy-pathogenesis, treatment and prevention." Nat Rev Gastroenterol Hepatol.
- Hauer-Jensen, M., L. Poulakos and J. W. Osborne (1988). "Effects of accelerated fractionation on radiation injury of the small intestine: a new rat model." Int J Radiat Oncol Biol Phys **14**(6): 1205-1212.

- Hauer-Jensen, M., K. K. Richter, J. Wang, E. Abe, C. C. Sung and J. W. Hardin (1998). "Changes in transforming growth factor beta1 gene expression and immunoreactivity levels during development of chronic radiation enteropathy." Radiat Res **150**(6): 673-680.
- Hauer-Jensen, M., J. Wang and J. W. Denham (2003). "Bowel injury: current and evolving management strategies." Semin Radiat Oncol **13**(3): 357-371.
- Hauer Jensen, M., T. Sauer, F. Devik and K. Nygaard (1983). "Effects of dose fractionation on late roentgen radiation damage of rat small intestine." Acta Radiol Oncol **22**(5): 381-384.
- Haydont, V., D. Mathe, C. Bourcier, J. Abdelali, J. Aigueperse, J. Bourhis and M. C. Vozenin-Brotons (2005). "Induction of CTGF by TGF-beta1 in normal and radiation enteritis human smooth muscle cells: Smad/Rho balance and therapeutic perspectives." Radiother Oncol **76**(2): 219-225.
- Haydont, V., B. L. Riser, J. Aigueperse and M. C. Vozenin-Brotons (2008). "Specific signals involved in the long-term maintenance of radiation-induced fibrogenic differentiation: a role for CCN2 and low concentration of TGF-beta1." Am J Physiol Cell Physiol **294**(6): C1332-1341.
- Heckmann, M., K. Douwes, R. Peter and K. Degitz (1998). "Vascular activation of adhesion molecule mRNA and cell surface expression by ionizing radiation." Exp Cell Res **238**(1): 148-154.
- Heemsbergen, W. D., S. T. Peeters, P. C. Koper, M. S. Hoogeman and J. V. Lebesque (2006). "Acute and late gastrointestinal toxicity after radiotherapy in prostate cancer patients: consequential late damage." Int J Radiat Oncol Biol Phys **66**(1): 3-10.
- Heffner, C. S., C. Herbert Pratt, R. P. Babiuk, Y. Sharma, S. F. Rockwood, L. R. Donahue, J. T. Eppig and S. A. Murray (2012). "Supporting conditional mouse mutagenesis with a comprehensive cre characterization resource." Nat Commun **3**: 1218.
- Hendry, J. H., C. Booth and C. S. Potten (2001). "Endothelial cells and radiation gastrointestinal syndrome." Science **294**(5546): 1411.
- Hennequin, C., L. Quero, H. Soudi, G. Sergent and C. Maylin (2006). "[Conformal radiotherapy of prostate cancer]." Ann Urol (Paris) **40**(4): 233-240.
- Hill, R. P., H. P. Rodemann, J. H. Hendry, S. A. Roberts and M. S. Anscher (2001). "Normal tissue radiobiology: from the laboratory to the clinic." Int J Radiat Oncol Biol Phys **49**(2): 353-365.
- Hille, A., H. Christiansen, O. Pradier, R. M. Hermann, B. Siekmeyer, E. Weiss, R. Hilgers, C. F. Hess and H. Schmidberger (2005). "Effect of pentoxifylline and tocopherol on radiation proctitis/enteritis." Strahlenther Onkol **181**(9): 606-614.
- Hinz, B., S. H. Phan, V. J. Thannickal, A. Galli, M. L. Bochaton-Piallat and G. Gabbiani (2007). "The myofibroblast: one function, multiple origins." Am J Pathol **170**(6): 1807-1816.
- Hneino, M., K. Blirando, V. Buard, G. Tarlet, M. Benderitter, P. Hoodless, A. Francois and F. Milliat (2012a). "The TG-interacting factor TGIF1 regulates stress-induced proinflammatory phenotype of endothelial cells." J Biol Chem **287**(46): 38913-38921.
- Hneino, M., A. Francois, V. Buard, G. Tarlet, R. Abderrahmani, K. Blirando, P. A. Hoodless, M. Benderitter and F. Milliat (2012b). "The TGF-beta/Smad repressor TG-interacting factor 1 (TGIF1) plays a role in radiation-induced intestinal injury independently of a Smad signaling pathway." PLoS One **7**(5): e35672.
- Horwitz, E. M. (2010). "Building bone from blood vessels." Nat Med **16**(12): 1373-1374.

- Hovdenak, N., J. Wang, C. C. Sung, T. Kelly, L. F. Fajardo and M. Hauer-Jensen (2002). "Clinical significance of increased gelatinolytic activity in the rectal mucosa during external beam radiation therapy of prostate cancer." Int J Radiat Oncol Biol Phys **53**(4): 919-927.
- Humphries, A. and N. A. Wright (2008). "Colonic crypt organization and tumorigenesis." Nat Rev Cancer **8**(6): 415-424.
- Igarashi, K., I. Sakimoto, K. Kataoka, K. Ohta and M. Miura (2007). "Radiation-induced senescence-like phenotype in proliferating and plateau-phase vascular endothelial cells." Exp Cell Res **313**(15): 3326-3336.
- Iglesias-Bartolome, R., V. Patel, A. Cotrim, K. Leelahavanichkul, A. A. Molinolo, J. B. Mitchell and J. S. Gutkind (2012). "mTOR inhibition prevents epithelial stem cell senescence and protects from radiation-induced mucositis." Cell Stem Cell **11**(3): 401-414.
- Ishisaki, A., H. Tsunobuchi, K. Nakajima and T. Imamura (2004). "Possible involvement of protein kinase C activation in differentiation of human umbilical vein endothelium-derived cell into smooth muscle-like cell." Biol Cell **96**(7): 499-508.
- Iso, T., L. Kedes and Y. Hamamori (2003). "HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway." J Cell Physiol **194**(3): 237-255.
- Jereczek-Fossa, B. A., J. Jassem and A. Badzio (2002). "Relationship between acute and late normal tissue injury after postoperative radiotherapy in endometrial cancer." Int J Radiat Oncol Biol Phys **52**(2): 476-482.
- Jimenez, S. A. (2013). "Role of endothelial to mesenchymal transition in the pathogenesis of the vascular alterations in systemic sclerosis." ISRN Rheumatol **2013**: 835948.
- Jones, N., K. Iljin, D. J. Dumont and K. Alitalo (2001). "Tie receptors: new modulators of angiogenic and lymphangiogenic responses." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(4): 257-267.
- Joubert, D., F. Hollande, P. Jay and C. Legraverend (2009). "[Intestinal stem cells: thirty years of a long and exemplary story]." Med Sci (Paris) **25**(5): 441-444.
- Jullien, N., K. Blirando, F. Milliat, J. C. Sabourin, M. Benderitter and A. Francois (2009). "Up-regulation of endothelin type a receptor in human and rat radiation proctitis: preclinical therapeutic approach with endothelin receptor blockade." Int J Radiat Oncol Biol Phys **74**(2): 528-538.
- Kalamida, D., I. V. Karagounis, A. Giatromanolaki and M. I. Koukourakis (2014). "Important role of autophagy in endothelial cell response to ionizing radiation." PLoS One **9**(7): e102408.
- Kalluri, R. (2009). "EMT: when epithelial cells decide to become mesenchymal-like cells." J Clin Invest **119**(6): 1417-1419.
- Kalluri, R. and R. A. Weinberg (2009). "The basics of epithelial-mesenchymal transition." J Clin Invest **119**(6): 1420-1428.
- Kalluri, R. and M. Zeisberg (2006). "Fibroblasts in cancer." Nat Rev Cancer **6**(5): 392-401.
- Kanakaris, N. K., G. M. Calori, R. Verdonk, P. Burssens, P. De Biase, R. Capanna, L. B. Vangosa, P. Cherubino, F. Baldo, J. Ristiniemi, G. Kontakis and P. V. Giannoudis (2008). "Application of BMP-7 to tibial non-unions: a 3-year multicenter experience." Injury **39 Suppl 2**: S83-90.
- Kantara, C., S. M. Moya, C. W. Houchen, S. Umar, R. L. Ullrich, P. Singh and D. H. Carney (2015). "Novel regenerative peptide TP508 mitigates radiation-induced gastrointestinal damage by activating stem cells and preserving crypt integrity." Lab Invest.

- Kim, M., S. H. Choi, Y. B. Jin, H. J. Lee, Y. H. Ji, J. Kim, Y. S. Lee and Y. J. Lee (2013). "The effect of oxidized low-density lipoprotein (ox-LDL) on radiation-induced endothelial-to-mesenchymal transition." *Int J Radiat Biol* **89**(5): 356-363.
- Kirsch, D. G., P. M. Santiago, E. di Tomaso, J. M. Sullivan, W. S. Hou, T. Dayton, L. B. Jeffords, P. Sodha, K. L. Mercer, R. Cohen, O. Takeuchi, S. J. Korsmeyer, R. T. Bronson, C. F. Kim, K. M. Haigis, R. K. Jain and T. Jacks (2010). "p53 controls radiation-induced gastrointestinal syndrome in mice independent of apoptosis." *Science* **327**(5965): 593-596.
- Kisanuki, Y. Y., R. E. Hammer, J. Miyazaki, S. C. Williams, J. A. Richardson and M. Yanagisawa (2001). "Tie2-Cre transgenic mice: a new model for endothelial cell-lineage analysis in vivo." *Dev Biol* **230**(2): 230-242.
- Kluppel, M. and J. L. Wrana (2005). "Turning it up a Notch: cross-talk between TGF beta and Notch signaling." *Bioessays* **27**(2): 115-118.
- Kobolak, J., A. Dinnyes, A. Memic, A. Khademhosseini and A. Mobasheri (2015). "Mesenchymal stem cells: identification, phenotypic characterization, biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial micro engineering of their niche." *Methods*.
- Kokubo, H., S. Miyagawa-Tomita and R. L. Johnson (2005a). "Hesr, a mediator of the Notch signaling, functions in heart and vessel development." *Trends Cardiovasc Med* **15**(5): 190-194.
- Kokubo, H., S. Miyagawa-Tomita, Y. Nakashima, T. Kume, M. Yoshizumi, T. Nakanishi and Y. Saga (2013). "Hesr2 knockout mice develop aortic valve disease with advancing age." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **33**(3): e84-92.
- Kokubo, H., S. Miyagawa-Tomita, M. Nakazawa, Y. Saga and R. L. Johnson (2005b). "Mouse hesr1 and hesr2 genes are redundantly required to mediate Notch signaling in the developing cardiovascular system." *Dev Biol* **278**(2): 301-309.
- Kokudo, T., Y. Suzuki, Y. Yoshimatsu, T. Yamazaki, T. Watabe and K. Miyazono (2008). "Snail is required for TGFbeta-induced endothelial-mesenchymal transition of embryonic stem cell-derived endothelial cells." *J Cell Sci* **121**(Pt 20): 3317-3324.
- Kovacic, J. C., N. Mercader, M. Torres, M. Boehm and V. Fuster (2012). "Epithelial-to-mesenchymal and endothelial-to-mesenchymal transition: from cardiovascular development to disease." *Circulation* **125**(14): 1795-1808.
- Krishnan, L., E. C. Krishnan and W. R. Jewell (1988). "Immediate effect of irradiation on microvasculature." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **15**(1): 147-150.
- Krizbai, I. A., A. Gasparics, P. Nagyoszi, C. Fazakas, J. Molnar, I. Wilhelm, R. Bencs, L. Rosivall and A. Sebe (2015). "Endothelial-mesenchymal transition of brain endothelial cells: possible role during metastatic extravasation." *PLoS One* **10**(3): e0123845.
- Lagendijk, A. K., A. Szabo, R. M. Merks and J. Bakkers (2013). "Hyaluronan: a critical regulator of endothelial-to-mesenchymal transition during cardiac valve formation." *Trends Cardiovasc Med* **23**(5): 135-142.
- Lai, E. C. (2004). "Notch signaling: control of cell communication and cell fate." *Development* **131**(5): 965-973.
- Langberg, C. W., T. Sauer, J. B. Reitan and M. Hauer-Jensen (1992). "Tolerance of rat small intestine to localized single dose and fractionated irradiation." *Acta Oncol* **31**(7): 781-787.



- Larsen, A., J. B. Reitan, S. T. Aase and M. Hauer-Jensen (2007). "Long-term prognosis in patients with severe late radiation enteropathy: a prospective cohort study." World J Gastroenterol **13**(26): 3610-3613.
- Latif, N., P. Sarathchandra, P. S. Thomas, J. Antoniow, P. Batten, A. H. Chester, P. M. Taylor and M. H. Yacoub (2007). "Characterization of structural and signaling molecules by human valve interstitial cells and comparison to human mesenchymal stem cells." J Heart Valve Dis **16**(1): 56-66.
- LeBleu, V. S., G. Taduri, J. O'Connell, Y. Teng, V. G. Cooke, C. Woda, H. Sugimoto and R. Kalluri (2013). "Origin and function of myofibroblasts in kidney fibrosis." Nat Med **19**(8): 1047-1053.
- Leimeister, C., A. Externbrink, B. Klamt and M. Gessler (1999). "Hey genes: a novel subfamily of hairy- and Enhancer of split related genes specifically expressed during mouse embryogenesis." Mech Dev **85**(1-2): 173-177.
- Leiper, K. and A. I. Morris (2007). "Treatment of radiation proctitis." Clin Oncol (R Coll Radiol) **19**(9): 724-729.
- Lewinson, D., G. Maor, N. Rozen, I. Rabinovich, S. Stahl and A. Rachmiel (2001). "Expression of vascular antigens by bone cells during bone regeneration in a membranous bone distraction system." Histochem Cell Biol **116**(5): 381-388.
- Li, C., F. Dong, Y. Jia, H. Du, N. Dong, Y. Xu, S. Wang, H. Wu, Z. Liu and W. Li (2013). "Notch signal regulates corneal endothelial-to-mesenchymal transition." Am J Pathol **183**(3): 786-795.
- Li, J., X. Qu and J. F. Bertram (2009). "Endothelial-myofibroblast transition contributes to the early development of diabetic renal interstitial fibrosis in streptozotocin-induced diabetic mice." Am J Pathol **175**(4): 1380-1388.
- Li, J., X. Qu, J. Yao, G. Caruana, S. D. Ricardo, Y. Yamamoto, H. Yamamoto and J. F. Bertram (2010). "Blockade of endothelial-mesenchymal transition by a Smad3 inhibitor delays the early development of streptozotocin-induced diabetic nephropathy." Diabetes **59**(10): 2612-2624.
- Li, Z. and S. A. Jimenez (2011). "Protein kinase Cdelta and c-Abl kinase are required for transforming growth factor beta induction of endothelial-mesenchymal transition in vitro." Arthritis Rheum **63**(8): 2473-2483.
- Liao, W. C., A. Haimovitz-Friedman, R. S. Persaud, M. McLoughlin, D. Ehleiter, N. Zhang, M. Gatei, M. Lavin, R. Kolesnick and Z. Fuks (1999). "Ataxia telangiectasia-mutated gene product inhibits DNA damage-induced apoptosis via ceramide synthase." J Biol Chem **274**(25): 17908-17917.
- Lin, F., N. Wang and T. C. Zhang (2012). "The role of endothelial-mesenchymal transition in development and pathological process." IUBMB Life **64**(9): 717-723.
- Linard, C., F. Billiard and M. Benderitter (2012). "Intestinal irradiation and fibrosis in a Th1-deficient environment." Int J Radiat Oncol Biol Phys **84**(1): 266-273.
- Linard, C., E. Busson, V. Holler, C. Strup-Perrot, J. V. Lacave-Lapalun, B. Lhomme, M. Prat, P. Devauchelle, J. C. Sabourin, J. M. Simon, M. Bonneau, J. J. Lataillade and M. Benderitter (2013). "Repeated autologous bone marrow-derived mesenchymal stem cell injections improve radiation-induced proctitis in pigs." Stem Cells Transl Med **2**(11): 916-927.

- Liu, J., F. Dong, J. Jeong, T. Masuda and C. G. Lobe (2014). "Constitutively active Notch1 signaling promotes endothelial-mesenchymal transition in a conditional transgenic mouse model." Int J Mol Med **34**(3): 669-676.
- Liu, Y. (2011). "Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis." Nat Rev Nephrol **7**(12): 684-696.
- Liu, Y., K. Kudo, Y. Abe, M. Aoki, D. L. Hu, H. Kijima and A. Nakane (2008). "Hypoxia expression in radiation-induced late rectal injury." J Radiat Res **49**(3): 261-268.
- Liu, Z. J., Y. Tan, G. W. Beecham, D. M. Seo, R. Tian, Y. Li, R. I. Vazquez-Padron, M. Pericak-Vance, J. M. Vance, P. J. Goldschmidt-Clermont, A. S. Livingstone and O. C. Velazquez (2012). "Notch activation induces endothelial cell senescence and pro-inflammatory response: implication of Notch signaling in atherosclerosis." Atherosclerosis **225**(2): 296-303.
- Lopez, D., G. Niu, P. Huber and W. B. Carter (2009). "Tumor-induced upregulation of Twist, Snail, and Slug represses the activity of the human VE-cadherin promoter." Arch Biochem Biophys **482**(1-2): 77-82.
- Maj, J. G., F. Paris, A. Haimovitz-Friedman, E. Venkatraman, R. Kolesnick and Z. Fuks (2003). "Microvascular function regulates intestinal crypt response to radiation." Cancer Res **63**(15): 4338-4341.
- Maleszewska, M., J. R. Moonen, N. Huijckman, B. van de Sluis, G. Krenning and M. C. Harmsen (2013). "IL-1beta and TGFbeta2 synergistically induce endothelial to mesenchymal transition in an NFkappaB-dependent manner." Immunobiology **218**(4): 443-454.
- Marathe, S., S. L. Schissel, M. J. Yellin, N. Beatini, R. Mintzer, K. J. Williams and I. Tabas (1998). "Human vascular endothelial cells are a rich and regulatable source of secretory sphingomyelinase. Implications for early atherogenesis and ceramide-mediated cell signaling." J Biol Chem **273**(7): 4081-4088.
- Markwald, R. R., T. P. Fitzharris and W. N. Smith (1975). "Structural analysis of endocardial cytodifferentiation." Dev Biol **42**(1): 160-180.
- Marshman, E., C. Booth and C. S. Potten (2002). "The intestinal epithelial stem cell." Bioessays **24**(1): 91-98.
- Martin, M., S. Delanian, V. Sivan, M. C. Vozenin-Brotans, P. Reisdorf, D. Lawrence and J. L. Lefaix (2000). "[Radiation-induced superficial fibrosis and TGF-alpha 1]." Cancer Radiother **4**(5): 369-384.
- Mayeuf, A. and F. Relaix (2011). "[Notch pathway: from development to regeneration of skeletal muscle]." Med Sci (Paris) **27**(5): 521-526.
- Medici, D. and R. Kalluri (2012). "Endothelial-mesenchymal transition and its contribution to the emergence of stem cell phenotype." Semin Cancer Biol **22**(5-6): 379-384.
- Medici, D., S. Potenta and R. Kalluri (2011). "Transforming growth factor-beta2 promotes Snail-mediated endothelial-mesenchymal transition through convergence of Smad-dependent and Smad-independent signalling." Biochem J **437**(3): 515-520.
- Medici, D., E. M. Shore, V. Y. Lounev, F. S. Kaplan, R. Kalluri and B. R. Olsen (2010). "Conversion of vascular endothelial cells into multipotent stem-like cells." Nat Med **16**(12): 1400-1406.
- Milliat, F., A. Francois, M. Isoir, E. Deutsch, R. Tamarat, G. Tarlet, A. Atfi, P. Validire, J. Bourhis, J. C. Sabourin and M. Benderitter (2006). "Influence of endothelial cells on vascular smooth muscle cells phenotype after irradiation: implication in radiation-induced vascular damages." Am J Pathol **169**(4): 1484-1495.

- Milliat, F., A. Francois, R. Tamarat and M. Benderitter (2008a). "[Role of endothelium in radiation-induced normal tissue damages]." Ann Cardiol Angeiol (Paris) **57**(3): 139-148.
- Milliat, F., J. C. Sabourin, G. Tarlet, V. Holler, E. Deutsch, V. Buard, R. Tamarat, A. Atfi, M. Benderitter and A. Francois (2008b). "Essential role of plasminogen activator inhibitor type-1 in radiation enteropathy." Am J Pathol **172**(3): 691-701.
- Molla, M., M. Gironella, R. Miquel, V. Tovar, P. Engel, A. Biete, J. M. Pique and J. Panes (2003). "Relative roles of ICAM-1 and VCAM-1 in the pathogenesis of experimental radiation-induced intestinal inflammation." Int J Radiat Oncol Biol Phys **57**(1): 264-273.
- Molla, M., M. Gironella, A. Salas, R. Miquel, S. Perez-del-Pulgar, C. Conill, P. Engel, A. Biete, J. M. Pique and J. Panes (2001). "Role of P-selectin in radiation-induced intestinal inflammatory damage." Int J Cancer **96**(2): 99-109.
- Molla, M. and J. Panes (2007). "Radiation-induced intestinal inflammation." World J Gastroenterol **13**(22): 3043-3046.
- Montorfano, I., A. Becerra, R. Cerro, C. Echeverria, E. Saez, M. G. Morales, R. Fernandez, C. Cabello-Verrugio and F. Simon (2014). "Oxidative stress mediates the conversion of endothelial cells into myofibroblasts via a TGF-beta1 and TGF-beta2-dependent pathway." Lab Invest **94**(10): 1068-1082.
- Morales-Piga, A., F. J. Bachiller-Corral and G. Sanchez-Duffhues (2014). "Is "fibrodysplasia ossificans progressiva" a vascular disease? A groundbreaking pathogenic model." Reumatol Clin **10**(6): 389-395.
- Motoike, T., S. Loughna, E. Perens, B. L. Roman, W. Liao, T. C. Chau, C. D. Richardson, T. Kawate, J. Kuno, B. M. Weinstein, D. Y. Stainier and T. N. Sato (2000). "Universal GFP reporter for the study of vascular development." Genesis **28**(2): 75-81.
- Mouthon, M. A., V. Vereycken-Holler, A. Van der Meer and M. H. Gaugler (2003). "Irradiation increases the interactions of platelets with the endothelium in vivo: analysis by intravital microscopy." Radiat Res **160**(5): 593-599.
- Nakajima, Y., V. Mironov, T. Yamagishi, H. Nakamura and R. R. Markwald (1997). "Expression of smooth muscle alpha-actin in mesenchymal cells during formation of avian endocardial cushion tissue: a role for transforming growth factor beta3." Dev Dyn **209**(3): 296-309.
- Niessen, K., Y. Fu, L. Chang, P. A. Hoodless, D. McFadden and A. Karsan (2008). "Slug is a direct Notch target required for initiation of cardiac cushion cellularization." J Cell Biol **182**(2): 315-325.
- Noseda, M., Y. Fu, K. Niessen, F. Wong, L. Chang, G. McLean and A. Karsan (2006). "Smooth Muscle alpha-actin is a direct target of Notch/CSL." Circ Res **98**(12): 1468-1470.
- Noseda, M., G. McLean, K. Niessen, L. Chang, I. Pollet, R. Montpetit, R. Shahidi, K. Dorovini-Zis, L. Li, B. Beckstead, R. E. Durand, P. A. Hoodless and A. Karsan (2004). "Notch activation results in phenotypic and functional changes consistent with endothelial-to-mesenchymal transformation." Circ Res **94**(7): 910-917.
- Oh, C. W., E. A. Bump, J. S. Kim, D. Janigro and M. R. Mayberg (2001). "Induction of a senescence-like phenotype in bovine aortic endothelial cells by ionizing radiation." Radiat Res **156**(3): 232-240.
- Ohri, N., A. P. Dicker and T. N. Showalter (2012). "Late toxicity rates following definitive radiotherapy for prostate cancer." Can J Urol **19**(4): 6373-6380.

- Okayama, K., J. Azuma, N. Dosaka, K. Iekushi, F. Sanada, H. Kusunoki, M. Iwabayashi, H. Rakugi, Y. Taniyama and R. Morishita (2012). "Hepatocyte growth factor reduces cardiac fibrosis by inhibiting endothelial-mesenchymal transition." Hypertension **59**(5): 958-965.
- Okunieff, P., T. Cornelison, M. Mester, W. Liu, I. Ding, Y. Chen, H. Zhang, J. P. Williams and J. Finkelstein (2005). "Mechanism and modification of gastrointestinal soft tissue response to radiation: role of growth factors." Int J Radiat Oncol Biol Phys **62**(1): 273-278.
- Okunieff, P., M. Mester, J. Wang, T. Maddox, X. Gong, D. Tang, M. Coffee and I. Ding (1998). "In vivo radioprotective effects of angiogenic growth factors on the small bowel of C3H mice." Radiat Res **150**(2): 204-211.
- Ong, Z. Y., R. J. Gibson, J. M. Bowen, A. M. Stringer, J. M. Darby, R. M. Logan, A. S. Yeoh and D. M. Keefe (2010). "Pro-inflammatory cytokines play a key role in the development of radiotherapy-induced gastrointestinal mucositis." Radiat Oncol **5**: 22.
- Otterson, M. F., L. Nie, J. L. Schmidt, B. J. Link, N. Jovanovic, O. Lyros and P. Rafiee (2012). "EUK-207 protects human intestinal microvascular endothelial cells (HIMEC) against irradiation-induced apoptosis through the Bcl2 pathway." Life Sci **91**(15-16): 771-782.
- Panes, J., D. C. Anderson, M. Miyasaka and D. N. Granger (1995). "Role of leukocyte-endothelial cell adhesion in radiation-induced microvascular dysfunction in rats." Gastroenterology **108**(6): 1761-1769.
- Panganiban, R. A., O. Mungunsukh and R. M. Day (2013). "X-irradiation induces ER stress, apoptosis, and senescence in pulmonary artery endothelial cells." Int J Radiat Biol **89**(8): 656-667.
- Paranya, G., S. Vineberg, E. Dvorin, S. Kaushal, S. J. Roth, E. Rabkin, F. J. Schoen and J. Bischoff (2001). "Aortic valve endothelial cells undergo transforming growth factor-beta-mediated and non-transforming growth factor-beta-mediated transdifferentiation in vitro." Am J Pathol **159**(4): 1335-1343.
- Pardo, A. and M. Selman (2006). "Matrix metalloproteases in aberrant fibrotic tissue remodeling." Proc Am Thorac Soc **3**(4): 383-388.
- Paris, F., Z. Fuks, A. Kang, P. Capodiec, G. Juan, D. Ehleiter, A. Haimovitz-Friedman, C. Cordon-Cardo and R. Kolesnick (2001). "Endothelial apoptosis as the primary lesion initiating intestinal radiation damage in mice." Science **293**(5528): 293-297.
- Paruchuri, S., J. H. Yang, E. Aikawa, J. M. Melero-Martin, Z. A. Khan, S. Loukogeorgakis, F. J. Schoen and J. Bischoff (2006). "Human pulmonary valve progenitor cells exhibit endothelial/mesenchymal plasticity in response to vascular endothelial growth factor-A and transforming growth factor-beta2." Circ Res **99**(8): 861-869.
- Peichev, M., A. J. Naiyer, D. Pereira, Z. Zhu, W. J. Lane, M. Williams, M. C. Oz, D. J. Hicklin, L. Witte, M. A. Moore and S. Rafii (2000). "Expression of VEGFR-2 and AC133 by circulating human CD34(+) cells identifies a population of functional endothelial precursors." Blood **95**(3): 952-958.
- Peiffert, D., J. M. Simon and F. Eschwege (2007). "[Epinal radiotherapy accident: passed, present, future]." Cancer Radiother **11**(6-7): 309-312.
- Person, A. D., S. E. Klewer and R. B. Runyan (2005). "Cell biology of cardiac cushion development." Int Rev Cytol **243**: 287-335.

- Peters, L. J., K. K. Ang and H. D. Thames, Jr. (1988). "Accelerated fractionation in the radiation treatment of head and neck cancer. A critical comparison of different strategies." Acta Oncol **27**(2): 185-194.
- Piera-Velazquez, S. and S. A. Jimenez (2012). "Molecular mechanisms of endothelial to mesenchymal cell transition (EndoMT) in experimentally induced fibrotic diseases." Fibrogenesis Tissue Repair **5**(Suppl 1): S7.
- Piera-Velazquez, S., Z. Li and S. A. Jimenez (2011). "Role of endothelial-mesenchymal transition (EndoMT) in the pathogenesis of fibrotic disorders." Am J Pathol **179**(3): 1074-1080.
- Pober, J. S. and W. C. Sessa (2007). "Evolving functions of endothelial cells in inflammation." Nat Rev Immunol **7**(10): 803-815.
- Poli, G. and M. Parola (1997). "Oxidative damage and fibrogenesis." Free Radic Biol Med **22**(1-2): 287-305.
- Potenta, S., E. Zeisberg and R. Kalluri (2008). "The role of endothelial-to-mesenchymal transition in cancer progression." Br J Cancer **99**(9): 1375-1379.
- Potten, C. S. (1977). "Extreme sensitivity of some intestinal crypt cells to X and gamma irradiation." Nature **269**(5628): 518-521.
- Principi, M., F. Giorgio, G. Losurdo, V. Neve, A. Contaldo, A. Di Leo and E. Ierardi (2013). "Fibrogenesis and fibrosis in inflammatory bowel diseases: Good and bad side of same coin?" World J Gastrointest Pathophysiol **4**(4): 100-107.
- Prise, K. M., G. Schettino, M. Folkard and K. D. Held (2005). "New insights on cell death from radiation exposure." Lancet Oncol **6**(7): 520-528.
- Qiu, W., E. B. Carson-Walter, H. Liu, M. Epperly, J. S. Greenberger, G. P. Zambetti, L. Zhang and J. Yu (2008). "PUMA regulates intestinal progenitor cell radiosensitivity and gastrointestinal syndrome." Cell Stem Cell **2**(6): 576-583.
- Quarmby, S., P. Kumar and S. Kumar (1999a). "Radiation-induced normal tissue injury: role of adhesion molecules in leukocyte-endothelial cell interactions." Int J Cancer **82**(3): 385-395.
- Quarmby, S., P. Kumar, J. Wang, J. A. Macro, J. J. Hutchinson, R. D. Hunter and S. Kumar (1999b). "Irradiation induces upregulation of CD31 in human endothelial cells." Arterioscler Thromb Vasc Biol **19**(3): 588-597.
- Ranchoux, B., F. Antigny, C. Rucker-Martin, A. Hautefort, C. Pechoux, H. J. Bogaard, P. Dorfmueller, S. Remy, F. Lecerf, S. Plante, S. Chat, E. Fadel, A. Houssaini, I. Anegon, S. Adnot, G. Simonneau, M. Humbert, S. Cohen-Kaminsky and F. Perros (2015). "Endothelial-to-mesenchymal transition in pulmonary hypertension." Circulation **131**(11): 1006-1018.
- Rannou, E., A. François, A. Toullec, O. Guipaud, V. Buard, G. Tarlet, E. Mintet, M. Iruela-Arispe, M. Benderitter, J. Sabourin and F. Milliat (2015). "In vivo evidence for an endothelium-dependent mechanism in radiation-induced normal tissue injury." Scientific Reports.
- Rechner, L. A., R. M. Howell, R. Zhang, C. Etzel, A. K. Lee and W. D. Newhauser (2012). "Risk of radiogenic second cancers following volumetric modulated arc therapy and proton arc therapy for prostate cancer." Phys Med Biol **57**(21): 7117-7132.
- Riches, D. W., D. S. Backos and E. F. Redente (2015). "ROCK and Rho: Promising therapeutic targets to ameliorate pulmonary fibrosis." Am J Pathol **185**(4): 909-912.

- Richter, K. K., L. M. Fink, B. M. Hughes, H. M. Shmaysani, C. C. Sung and M. Hauer-Jensen (1998). "Differential effect of radiation on endothelial cell function in rectal cancer and normal rectum." Am J Surg **176**(6): 642-647.
- Richter, K. K., L. M. Fink, B. M. Hughes, C. C. Sung and M. Hauer-Jensen (1997a). "Is the loss of endothelial thrombomodulin involved in the mechanism of chronicity in late radiation enteropathy?" Radiother Oncol **44**(1): 65-71.
- Richter, K. K., C. W. Langberg, C. C. Sung and M. Hauer-Jensen (1997b). "Increased transforming growth factor beta (TGF-beta) immunoreactivity is independently associated with chronic injury in both consequential and primary radiation enteropathy." Int J Radiat Oncol Biol Phys **39**(1): 187-195.
- Rieder, F. and C. Fiocchi (2008). "Intestinal fibrosis in inflammatory bowel disease - Current knowledge and future perspectives." J Crohns Colitis **2**(4): 279-290.
- Rieder, F., S. P. Kessler, G. A. West, S. Bhilocha, C. de la Motte, T. M. Sadler, B. Gopalan, E. Stylianou and C. Fiocchi (2011). "Inflammation-induced endothelial-to-mesenchymal transition: a novel mechanism of intestinal fibrosis." Am J Pathol **179**(5): 2660-2673.
- Rosenbloom, J., F. A. Mendoza and S. A. Jimenez (2013). "Strategies for anti-fibrotic therapies." Biochim Biophys Acta **1832**(7): 1088-1103.
- Roth, N. M., M. R. Sontag and M. F. Kiani (1999). "Early effects of ionizing radiation on the microvascular networks in normal tissue." Radiat Res **151**(3): 270-277.
- Rotolo, J., B. Stancevic, J. Zhang, G. Hua, J. Fuller, X. Yin, A. Haimovitz-Friedman, K. Kim, M. Qian, M. Cardo-Vila, Z. Fuks, R. Pasqualini, W. Arap and R. Kolesnick (2012). "Anti-ceramide antibody prevents the radiation gastrointestinal syndrome in mice." J Clin Invest **122**(5): 1786-1790.
- Rotolo, J. A., J. G. Maj, R. Feldman, D. Ren, A. Haimovitz-Friedman, C. Cordon-Cardo, E. H. Cheng, R. Kolesnick and Z. Fuks (2008). "Bax and Bak do not exhibit functional redundancy in mediating radiation-induced endothelial apoptosis in the intestinal mucosa." Int J Radiat Oncol Biol Phys **70**(3): 804-815.
- Rubin, P. and G. W. Casarett (1968). "Clinical radiation pathology as applied to curative radiotherapy." Cancer **22**(4): 767-778.
- Rubin, P., C. J. Johnston, J. P. Williams, S. McDonald and J. N. Finkelstein (1995). "A perpetual cascade of cytokines postirradiation leads to pulmonary fibrosis." Int J Radiat Oncol Biol Phys **33**(1): 99-109.
- Rubio, C. A. and M. Jalnas (1996). "Dose-time-dependent histological changes following irradiation of the small intestine of rats." Dig Dis Sci **41**(2): 392-401.
- Saito, A. (2013). "EMT and EndMT: regulated in similar ways?" J Biochem **153**(6): 493-495.
- Sakata, Y., C. N. Kamei, H. Nakagami, R. Bronson, J. K. Liao and M. T. Chin (2002). "Ventricular septal defect and cardiomyopathy in mice lacking the transcription factor CHF1/Hey2." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(25): 16197-16202.
- Sakata, Y., F. Xiang, Z. Chen, Y. Kiriama, C. N. Kamei, D. I. Simon and M. T. Chin (2004). "Transcription factor CHF1/Hey2 regulates neointimal formation in vivo and vascular smooth muscle proliferation and migration in vitro." Arterioscler Thromb Vasc Biol **24**(11): 2069-2074.
- Sangiorgi, E. and M. R. Capecchi (2008). "Bmi1 is expressed in vivo in intestinal stem cells." Nat Genet **40**(7): 915-920.
- Santana, P., L. A. Pena, A. Haimovitz-Friedman, S. Martin, D. Green, M. McLoughlin, C. Cordon-Cardo, E. H. Schuchman, Z. Fuks and R. Kolesnick (1996). "Acid



- sphingomyelinase-deficient human lymphoblasts and mice are defective in radiation-induced apoptosis." *Cell* **86**(2): 189-199.
- Sato, T. N., Y. Qin, C. A. Kozak and K. L. Audus (1993). "Tie-1 and tie-2 define another class of putative receptor tyrosine kinase genes expressed in early embryonic vascular system." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(20): 9355-9358.
- Schaue, D. and W. H. McBride (2010). "Links between innate immunity and normal tissue radiobiology." *Radiat Res* **173**(4): 406-417.
- Schnurch, H. and W. Risau (1993). "Expression of tie-2, a member of a novel family of receptor tyrosine kinases, in the endothelial cell lineage." *Development* **119**(3): 957-968.
- Schreiber, D., S. C. Chen, J. Rineer, M. Worth, T. Telivala and D. Schwartz (2014). "Assessment of risk of late rectal bleeding for patients with prostate cancer started on anticoagulation before or after radiation treatment." *Anticancer Res* **34**(12): 7367-7372.
- Schuller, B. W., P. J. Binns, K. J. Riley, L. Ma, M. F. Hawthorne and J. A. Coderre (2006). "Selective irradiation of the vascular endothelium has no effect on the survival of murine intestinal crypt stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(10): 3787-3792.
- Schuller, B. W., A. B. Rogers, K. S. Cormier, K. J. Riley, P. J. Binns, R. Julius, M. F. Hawthorne and J. A. Coderre (2007). "No significant endothelial apoptosis in the radiation-induced gastrointestinal syndrome." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **68**(1): 205-210.
- Semont, A., M. Mouiseddine, A. Francois, C. Demarquay, N. Mathieu, A. Chapel, A. Sache, D. Thierry, P. Laloi and P. Gourmelon (2010). "Mesenchymal stem cells improve small intestinal integrity through regulation of endogenous epithelial cell homeostasis." *Cell Death Differ* **17**(6): 952-961.
- Shi-wen, X., L. Kennedy, E. A. Renzoni, G. Bou-Gharios, R. M. du Bois, C. M. Black, C. P. Denton, D. J. Abraham and A. Leask (2007). "Endothelin is a downstream mediator of profibrotic responses to transforming growth factor beta in human lung fibroblasts." *Arthritis Rheum* **56**(12): 4189-4194.
- Shorr, A. F., J. M. Janes, A. Artigas, J. Tenhunen, D. L. Wyncoll, E. Mercier, B. Francois, J. L. Vincent, B. Vangerow, D. Heiselman, A. G. Leishman, Y. E. Zhu and K. Reinhart (2010). "Randomized trial evaluating serial protein C levels in severe sepsis patients treated with variable doses of drotrecogin alfa (activated)." *Crit Care* **14**(6): R229.
- Sidney, L. E., M. J. Branch, S. E. Dunphy, H. S. Dua and A. Hopkinson (2014). "Concise review: evidence for CD34 as a common marker for diverse progenitors." *Stem Cells* **32**(6): 1380-1389.
- Siemerink, M. J., I. Klaassen, I. M. Vogels, A. W. Griffioen, C. J. Van Noorden and R. O. Schlingemann (2012). "CD34 marks angiogenic tip cells in human vascular endothelial cell cultures." *Angiogenesis* **15**(1): 151-163.
- Simone, N. L., B. P. Soule, L. Gerber, E. Augustine, S. Smith, R. M. Altamus, J. B. Mitchell and K. A. Camphausen (2007). "Oral pirfenidone in patients with chronic fibrosis resulting from radiotherapy: a pilot study." *Radiat Oncol* **2**: 19.
- Singer, II, D. W. Kawka, D. M. Kazazis and R. A. Clark (1984). "In vivo co-distribution of fibronectin and actin fibers in granulation tissue: immunofluorescence and electron microscope studies of the fibronexus at the myofibroblast surface." *J Cell Biol* **98**(6): 2091-2106.

- Singh, K. K., F. Lovren, Y. Pan, A. Quan, A. Ramadan, P. N. Matkar, M. Ehsan, P. Sandhu, L. E. Mantella, N. Gupta, H. Teoh, M. Parotto, A. Tabuchi, W. M. Kuebler, M. Al-Omran, T. Finkel and S. Verma (2015). "The essential autophagy gene ATG7 modulates organ fibrosis via regulation of endothelial-to-mesenchymal transition." *J Biol Chem* **290**(5): 2547-2559.
- Skwarchuk, M. W. and E. L. Travis (1998a). "Changes in histology and fibrogenic cytokines in irradiated colorectum of two murine strains." *Int J Radiat Oncol Biol Phys* **42**(1): 169-178.
- Skwarchuk, M. W. and E. L. Travis (1998b). "Volume effects and epithelial regeneration in irradiated mouse colorectum." *Radiat Res* **149**(1): 1-10.
- Sommer, M., J. Gerth, G. Stein and G. Wolf (2005). "Transdifferentiation of endothelial and renal tubular epithelial cells into myofibroblast-like cells under in vitro conditions: a morphological analysis." *Cells Tissues Organs* **180**(4): 204-214.
- Specia, S., I. Giusti, F. Rieder and G. Latella (2012). "Cellular and molecular mechanisms of intestinal fibrosis." *World J Gastroenterol* **18**(28): 3635-3661.
- Strup-Perrot, C., D. Mathe, C. Linard, D. Violot, F. Milliat, A. Francois, J. Bourhis and M. C. Vozenin-Brotons (2004). "Global gene expression profiles reveal an increase in mRNA levels of collagens, MMPs, and TIMPs in late radiation enteritis." *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **287**(4): G875-885.
- Suit, H. D. and H. R. Withers (2001). "Endothelial cells and radiation gastrointestinal syndrome." *Science* **294**(5546): 1411.
- Supiot, S. and F. Paris (2012). "[Radiobiology dedicated to endothelium]." *Cancer Radiother* **16**(1): 11-15.
- Swencki-Underwood, B., J. K. Mills, J. Vennarini, K. Boakye, J. Luo, S. Pomerantz, M. R. Cunningham, F. X. Farrell, M. F. Naso and B. Amegadzie (2008). "Expression and characterization of a human BMP-7 variant with improved biochemical properties." *Protein Expr Purif* **57**(2): 312-319.
- Takahashi, K. (2012). "Cellular reprogramming--lowering gravity on Waddington's epigenetic landscape." *J Cell Sci* **125**(Pt 11): 2553-2560.
- Tampe, D. and M. Zeisberg (2014). "Potential approaches to reverse or repair renal fibrosis." *Nat Rev Nephrol* **10**(4): 226-237.
- Theis, V. S., R. Sripadam, V. Ramani and S. Lal (2010). "Chronic radiation enteritis." *Clin Oncol (R Coll Radiol)* **22**(1): 70-83.
- Thiagarajan, A. and N. G. Iyer (2014). "Radiation-induced sarcomas of the head and neck." *World J Clin Oncol* **5**(5): 973-981.
- Timmerman, L. A., J. Grego-Bessa, A. Raya, E. Bertran, J. M. Perez-Pomares, J. Diez, S. Aranda, S. Palomo, F. McCormick, J. C. Izpisua-Belmonte and J. L. de la Pompa (2004). "Notch promotes epithelial-mesenchymal transition during cardiac development and oncogenic transformation." *Genes Dev* **18**(1): 99-115.
- Toiyama, Y., K. Tanaka, Y. Inoue, Y. Mohri and M. Kusunoki (2015). "Circulating cell-free microRNAs as biomarkers for colorectal cancer." *Surg Today*.
- Tomasek, J. J., G. Gabbiani, B. Hinz, C. Chaponnier and R. A. Brown (2002). "Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling." *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**(5): 349-363.
- Torres, S., L. Thim, F. Milliat, M. C. Vozenin-Brotons, U. B. Olsen, I. Ahnfelt-Ronne, J. Bourhis, M. Benderitter and A. Francois (2007). "Glucagon-like peptide-2 improves both acute

- and late experimental radiation enteritis in the rat." Int J Radiat Oncol Biol Phys **69**(5): 1563-1571.
- Tucker, S. L., L. Dong, W. R. Bosch, J. Michalski, K. Winter, R. Mohan, J. A. Purdy, D. Kuban, A. K. Lee, M. R. Cheung, H. D. Thames and J. D. Cox (2010). "Late rectal toxicity on RTOG 94-06: analysis using a mixture Lyman model." Int J Radiat Oncol Biol Phys **78**(4): 1253-1260.
- Tureson, I., J. Carlsson, A. Brahme, B. Glimelius, B. Zackrisson and B. Stenerlow (2003). "Biological response to radiation therapy." Acta Oncol **42**(2): 92-106.
- Ubil, E., J. Duan, I. C. Pillai, M. Rosa-Garrido, Y. Wu, F. Bargiacchi, Y. Lu, S. Stanboully, J. Huang, M. Rojas, T. M. Vondriska, E. Stefani and A. Deb (2014). "Mesenchymal-endothelial transition contributes to cardiac neovascularization." Nature **514**(7524): 585-590.
- Usunier, B., M. Benderitter, R. Tamarat and A. Chapel (2014). "Management of fibrosis: the mesenchymal stromal cells breakthrough." Stem Cells Int **2014**: 340257.
- Van De Water, L., S. Varney and J. J. Tomasek (2013). "Mechanoregulation of the Myofibroblast in Wound Contraction, Scarring, and Fibrosis: Opportunities for New Therapeutic Intervention." Adv Wound Care (New Rochelle) **2**(4): 122-141.
- van Meeteren, L. A. and P. ten Dijke (2012). "Regulation of endothelial cell plasticity by TGF-beta." Cell Tissue Res **347**(1): 177-186.
- Vaughan, M. B., E. W. Howard and J. J. Tomasek (2000). "Transforming growth factor-beta1 promotes the morphological and functional differentiation of the myofibroblast." Exp Cell Res **257**(1): 180-189.
- Venkatesh, D., N. Fredette, B. Rostama, Y. Tang, C. P. Vary, L. Liaw and S. Urs (2011). "RhoA-mediated signaling in Notch-induced senescence-like growth arrest and endothelial barrier dysfunction." Arterioscler Thromb Vasc Biol **31**(4): 876-882.
- Verheij, M., R. Bose, X. H. Lin, B. Yao, W. D. Jarvis, S. Grant, M. J. Birrer, E. Szabo, L. I. Zon, J. M. Kyriakis, A. Haimovitz-Friedman, Z. Fuks and R. N. Kolesnick (1996). "Requirement for ceramide-initiated SAPK/JNK signalling in stress-induced apoptosis." Nature **380**(6569): 75-79.
- Verheij, M., L. G. Dewit, M. N. Boomgaard, H. J. Brinkman and J. A. van Mourik (1994). "Ionizing radiation enhances platelet adhesion to the extracellular matrix of human endothelial cells by an increase in the release of von Willebrand factor." Radiat Res **137**(2): 202-207.
- Voswinkel, J., S. Francois, J. M. Simon, M. Benderitter, N. C. Gorin, M. Mohty, L. Fouillard and A. Chapel (2013). "Use of mesenchymal stem cells (MSC) in chronic inflammatory fistulizing and fibrotic diseases: a comprehensive review." Clin Rev Allergy Immunol **45**(2): 180-192.
- Voyta, J. C., D. P. Via, C. E. Butterfield and B. R. Zetter (1984). "Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated-low density lipoprotein." J Cell Biol **99**(6): 2034-2040.
- Vozenin-Brotons, M. C., F. Milliat, C. Linard, C. Strup, A. Francois, J. C. Sabourin, P. Lasser, A. Lusinchi, E. Deutsch, T. Girinsky, J. Aigueperse, J. Bourhis and D. Mathe (2004). "Gene expression profile in human late radiation enteritis obtained by high-density cDNA array hybridization." Radiat Res **161**(3): 299-311.
- Vozenin-Brotons, M. C., F. Milliat, J. C. Sabourin, A. C. de Gouville, A. Francois, P. Lasser, P. Morice, C. Haie-Meder, A. Lusinchi, S. Antoun, J. Bourhis, D. Mathe, T. Girinsky and J.

- Aigueperse (2003). "Fibrogenic signals in patients with radiation enteritis are associated with increased connective tissue growth factor expression." Int J Radiat Oncol Biol Phys **56**(2): 561-572.
- Walkin, L., S. E. Herrick, A. Summers, P. E. Brenchley, C. M. Hoff, R. Korstanje and P. J. Margetts (2013). "The role of mouse strain differences in the susceptibility to fibrosis: a systematic review." Fibrogenesis Tissue Repair **6**(1): 18.
- Wang, C. J., S. W. Leung, H. C. Chen, L. M. Sun, F. M. Fang, E. Y. Huang, C. Y. Hsiung and C. C. Changchien (1998a). "The correlation of acute toxicity and late rectal injury in radiotherapy for cervical carcinoma: evidence suggestive of consequential late effect (CQLE)." Int J Radiat Oncol Biol Phys **40**(1): 85-91.
- Wang, J., M. Boerma, Q. Fu and M. Hauer-Jensen (2007). "Significance of endothelial dysfunction in the pathogenesis of early and delayed radiation enteropathy." World J Gastroenterol **13**(22): 3047-3055.
- Wang, J., H. Zheng, C. C. Sung, K. K. Richter and M. Hauer-Jensen (1998b). "Cellular sources of transforming growth factor-beta isoforms in early and chronic radiation enteropathy." Am J Pathol **153**(5): 1531-1540.
- Wang, Y., A. Meng, H. Lang, S. A. Brown, J. L. Konopa, M. S. Kindy, R. A. Schmiedt, J. S. Thompson and D. Zhou (2004). "Activation of nuclear factor kappaB In vivo selectively protects the murine small intestine against ionizing radiation-induced damage." Cancer Res **64**(17): 6240-6246.
- Weintraub, N. L., W. K. Jones and D. Manka (2010). "Understanding radiation-induced vascular disease." J Am Coll Cardiol **55**(12): 1237-1239.
- Widiantoro, B., N. Emoto, K. Nakayama, D. W. Anggrahini, S. Adiarto, N. Iwasa, K. Yagi, K. Miyagawa, Y. Rikitake, T. Suzuki, Y. Y. Kisanuki, M. Yanagisawa and K. Hirata (2010). "Endothelial cell-derived endothelin-1 promotes cardiac fibrosis in diabetic hearts through stimulation of endothelial-to-mesenchymal transition." Circulation **121**(22): 2407-2418.
- Wu, M., R. N. Tang, H. Liu, M. M. Pan, L. L. Lv, J. D. Zhang, S. D. Crowley and B. C. Liu (2014a). "Cinacalcet ameliorates cardiac fibrosis in uremic hearts through suppression of endothelial-to-mesenchymal transition." Int J Cardiol **171**(3): e65-69.
- Wu, M., R. N. Tang, H. Liu, M. Xu, M. M. Pan and B. C. Liu (2014b). "Cinacalcet attenuates the renal endothelial-to-mesenchymal transition in rats with adenine-induced renal failure." Am J Physiol Renal Physiol **306**(1): F138-146.
- Wylie-Sears, J., E. Aikawa, R. A. Levine, J. H. Yang and J. Bischoff (2011). "Mitral valve endothelial cells with osteogenic differentiation potential." Arterioscler Thromb Vasc Biol **31**(3): 598-607.
- Wylie-Sears, J., R. A. Levine and J. Bischoff (2014). "Losartan inhibits endothelial-to-mesenchymal transformation in mitral valve endothelial cells by blocking transforming growth factor-beta-induced phosphorylation of ERK." Biochem Biophys Res Commun **446**(4): 870-875.
- Wynn, T. A. (2008). "Cellular and molecular mechanisms of fibrosis." J Pathol **214**(2): 199-210.
- Xavier, S., R. Vasko, K. Matsumoto, J. A. Zullo, R. Chen, J. Maizel, P. N. Chander and M. S. Goligorsky (2015). "Curtailling endothelial TGF-beta signaling is sufficient to reduce endothelial-mesenchymal transition and fibrosis in CKD." J Am Soc Nephrol **26**(4): 817-829.

- Xin, M., E. M. Small, E. van Rooij, X. Qi, J. A. Richardson, D. Srivastava, O. Nakagawa and E. N. Olson (2007). "Essential roles of the bHLH transcription factor Hrt2 in repression of atrial gene expression and maintenance of postnatal cardiac function." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(19): 7975-7980.
- Yan, K. S., L. A. Chia, X. Li, A. Ootani, J. Su, J. Y. Lee, N. Su, Y. Luo, S. C. Heilshorn, M. R. Amieva, E. Sangiorgi, M. R. Capecchi and C. J. Kuo (2012). "The intestinal stem cell markers Bmi1 and Lgr5 identify two functionally distinct populations." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(2): 466-471.
- Yoshimatsu, Y. and T. Watabe (2011). "Roles of TGF-beta signals in endothelial-mesenchymal transition during cardiac fibrosis." Int J Inflam **2011**: 724080.
- Young, A. R. and M. Narita (2010). "Connecting autophagy to senescence in pathophysiology." Curr Opin Cell Biol **22**(2): 234-240.
- Yu, W., Z. Liu, S. An, J. Zhao, L. Xiao, Y. Gou, Y. Lin and J. Wang (2014). "The endothelial-mesenchymal transition (EndMT) and tissue regeneration." Curr Stem Cell Res Ther **9**(3): 196-204.
- Zanninelli, G., A. Vetuschi, R. Sferra, A. D'Angelo, A. Fratticci, M. A. Continenza, M. Chiamonte, E. Gaudio, R. Caprilli and G. Latella (2006). "Smad3 knock-out mice as a useful model to study intestinal fibrogenesis." World J Gastroenterol **12**(8): 1211-1218.
- Zanotti, S. and E. Canalis (2013). "Hairy and Enhancer of Split-related with YRPW motif (HEY)2 regulates bone remodeling in mice." J Biol Chem **288**(30): 21547-21557.
- Zeisberg, E. M., S. Potenta, L. Xie, M. Zeisberg and R. Kalluri (2007a). "Discovery of endothelial to mesenchymal transition as a source for carcinoma-associated fibroblasts." Cancer Res **67**(21): 10123-10128.
- Zeisberg, E. M., S. E. Potenta, H. Sugimoto, M. Zeisberg and R. Kalluri (2008). "Fibroblasts in kidney fibrosis emerge via endothelial-to-mesenchymal transition." J Am Soc Nephrol **19**(12): 2282-2287.
- Zeisberg, E. M., O. Tarnavski, M. Zeisberg, A. L. Dorfman, J. R. McMullen, E. Gustafsson, A. Chandraker, X. Yuan, W. T. Pu, A. B. Roberts, E. G. Neilson, M. H. Sayegh, S. Izumo and R. Kalluri (2007b). "Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis." Nat Med **13**(8): 952-961.
- Zeisberg, M., A. A. Shah and R. Kalluri (2005). "Bone morphogenic protein-7 induces mesenchymal to epithelial transition in adult renal fibroblasts and facilitates regeneration of injured kidney." J Biol Chem **280**(9): 8094-8100.
- Zhang, A. Y., F. Yi, S. Jin, M. Xia, Q. Z. Chen, E. Gulbins and P. L. Li (2007). "Acid sphingomyelinase and its redox amplification in formation of lipid raft redox signaling platforms in endothelial cells." Antioxid Redox Signal **9**(7): 817-828.
- Zhang, W., G. Chen, J. G. Ren and Y. F. Zhao (2013). "Bleomycin induces endothelial mesenchymal transition through activation of mTOR pathway: a possible mechanism contributing to the sclerotherapy of venous malformations." Br J Pharmacol **170**(6): 1210-1220.
- Zhao, J., W. Shi, Y. L. Wang, H. Chen, P. Bringas, Jr., M. B. Datto, J. P. Frederick, X. F. Wang and D. Warburton (2002). "Smad3 deficiency attenuates bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice." Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **282**(3): L585-593.

- Zheng, H., J. Wang, V. E. Koteliansky, P. J. Gotwals and M. Hauer-Jensen (2000). "Recombinant soluble transforming growth factor beta type II receptor ameliorates radiation enteropathy in mice." Gastroenterology **119**(5): 1286-1296.
- Zhou, H., X. Chen, L. Chen, X. Zhou, G. Zheng, H. Zhang, W. Huang and J. Cai (2014a). "Anti-fibrosis effect of scutellarin via inhibition of endothelial-mesenchymal transition on isoprenaline-induced myocardial fibrosis in rats." Molecules **19**(10): 15611-15623.
- Zhou, H., C. Fang, L. Zhang, Y. Deng, M. Wang and F. Meng (2014b). "Fasudil hydrochloride hydrate, a Rho-kinase inhibitor, ameliorates hepatic fibrosis in rats with type 2 diabetes." Chin Med J (Engl) **127**(2): 225-231.
- Zhou, Q., Y. Zhao, P. Li, X. Bai and C. Ruan (1992). "Thrombomodulin as a marker of radiation-induced endothelial cell injury." Radiat Res **131**(3): 285-289.
- Zhou, X., X. Chen, J. J. Cai, L. Z. Chen, Y. S. Gong, L. X. Wang, Z. Gao, H. Q. Zhang, W. J. Huang and H. Zhou (2015). "Relaxin inhibits cardiac fibrosis and endothelial-mesenchymal transition via the Notch pathway." Drug Des Devel Ther **9**: 4599-4611.
- Zhu, Y., Y. F. Huang, C. Kek and D. V. Bulavin (2013). "Apoptosis differently affects lineage tracing of Lgr5 and Bmi1 intestinal stem cell populations." Cell Stem Cell **12**(3): 298-303.
- Zilli, T., E. Benz and R. Miralbell (2014). "[Prostate-rectum spacers: optimization of prostate cancer irradiation]." Cancer Radiother **18**(3): 215-221; quiz 243-214, 247.



La fibrose digestive est une complication secondaire tardive de la radiothérapie dans 5 à 10% des patients traités pour des tumeurs de la sphère abdomino-pelvienne. Elle est caractérisée par une accumulation de matrice extracellulaire synthétisée par les cellules mésenchymateuses. La transition endothélium-mésenchyme (EndoMT), est un processus au cours duquel les cellules endothéliales expriment des marqueurs mésenchymateux en réponse au stress. L'EndoMT a été identifiée comme une source de cellules mésenchymateuses participant à la fibrose chez des patients atteints de maladie inflammatoire chronique de l'intestin. Cette étude s'est donc concentrée sur le rôle de l'EndoMT dans le développement de la fibrose intestinale radio-induite et d'identifier des cibles thérapeutiques potentielles.

Nos résultats ont révélé pour la première fois l'existence de l'EndoMT au niveau de la paroi rectale chez l'homme après radiothérapie. L'utilisation de souris exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur endothélial Tie2, nous a permis de localiser les cellules mésenchymateuses possédant une origine endothéliale, confirmant l'existence de l'EndoMT radio-induite dans notre modèle préclinique de rectite radique. *In vitro*, nous avons confirmé le changement phénotypique des cellules endothéliales irradiées.

Ce projet s'est ensuite concentré sur un acteur potentiel de l'EndoMT radio-induite, Hey2. La génération d'un modèle murin déficient pour Hey2 dans l'endothélium a révélé une diminution des dommages muqueux et de la fréquence l'EndoMT après irradiation. L'inhibition de Hey2 représente une nouvelle approche thérapeutique attrayante dans la réduction de la fibrose digestive radio-induite.

**Mots-clés** : EndoMT, Hey2, endothélium, rectite radique, fibrose intestinale, radiothérapie.

Fibrosis is identified as a chronic side effect occurring after radiotherapy for pelvic tumors in 5 to 10 % of patients. This pathological healing process is characterized by an accumulation of extracellular matrix synthesized by mesenchymal cells. Endothelial to mesenchymal transition (EndoMT), is a processes during which endothelial cells express mesenchymal markers in response to stress. EndoMT is identified as a new source of mesenchymal cells taking part to fibrosis development in patients suffering from inflammatory bowel diseases. Then, this study focused on the potential participation of EndoMT in radiation-induced intestinal fibrosis and tried to identify new therapeutics targets.

Interestingly, our results showed for the first time EndoMT in rectal tissues from patients who developed radiation proctitis following radiotherapy. We used an *in vivo* approach to follow the mesenchymal cells having an endothelial origin in a mouse model expressing the GFP under the control of an endothelial promoter, Tie2 (Tie2-GFP). Thereby, our results confirmed the existence of radiation-induced EndoMT in our preclinical model of radiation proctitis. *In vitro* characterization showed that irradiation induced a modulation of the endothelial phenotype through a mesenchymal profile, a hallmark of EndoMT.

This project also focused on a potential molecular actor, Hey2. In this context, we generated a transgenic mouse model in which Hey2 gene expression is repressed specifically in the endothelial compartment and observed a decrease in radiation-induced mucosal damages and EndoMT frequency. Consequently, inhibiting Hey2 expression could represent a new interesting therapeutic strategy.

**Keywords**: EndoMT, Hey2, endothelium, radiation proctitis, intestinal fibrosis, radiotherapy